

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**  
**“FEDERICO II”**



**Dipartimento di Strutture, Funzioni e Tecnologie Biologiche**

**Tesi di Dottorato di Ricerca in**  
**Biologia, Patologia e Igiene Ambientale in Medicina Veterinaria**  
**XXII ciclo – Triennio 2006-07/2008-09**

**“Espressione e analisi funzionale dei geni**  
***Soul/HBP* (heme binding protein) durante lo**  
**sviluppo renale di *Zebrafish*”**

**Coordinatore:**

**Prof. Giuseppe Paino**



**Tutor:**

**Prof.ssa Luciana Castaldo**

**Dott.ssa Fernanda Langellotto**

## Indice

1. Introduzione .....	5
1.1. Aspetti generali della funzionalità renale.....	5
1.1.1. Struttura del rene dei Mammiferi.....	6
1.1.2. Sviluppo e nefrogenesi del rene di Mammiferi.....	9
1.2. Sviluppo e nefrogenesi del rene di Zebrafish.....	10
1.2.1. Basi molecolari dello sviluppo del pronefro in <i>Zebrafish</i> .....	15
<i>Ret1</i> .....	19
<i>Gata3</i> .....	19
<i>Slc12a1</i> .....	20
<i>Trpm7</i> .....	21
1.3. Eme ed eritropoiesi .....	22
1.3.1 Malattie renali ed eritropoietiche .....	25
1.4. I geni <i>Soul</i> .....	27
1.5. Zebrafish come sistema modello nella ricerca .....	28
1.5.1 <i>Zebrafish</i> : sviluppo embrionale .....	30
2. Materiali e metodi .....	33
2.1. Nomenclatura .....	33

2.2. Analisi delle sequenze proteiche .....	33
2.3. Sintesi degli oligonucleotidi.....	33
2.4. Preparazione di RNA totali da embrioni e tessuti di Zebrafish.....	33
2.5. Sintesi del cDNA .....	34
2.6. Amplificazione mediante PCR.....	34
2.7. Clonaggio di soul1 in pBluescript SK- vector .....	36
2.8. Clonaggio di soul2 pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup> .....	38
2.9 Clonaggio di soul3 e soul4.....	40
2.10. Trasformazione di DNA plasmidico in cellule batteriche mediante elettroporazione .....	40
2.11. PCR colony .....	41
2.12. Maxipreparazione di DNA plasmidico .....	42
2.13. Sequenziamento del DNA plasmidico .....	43
2.15. Quantizzazione delle sonde a RNA .....	46
2.16. Preparazione degli animali.....	46
2.17. Ibridazione in situ.....	47
2.18. RT-PCR .....	48
2.19. Microiniezioni di oligonucleotidi antisenso (morfolino) in uova fecondate .....	48
2.20. Clonaggio e sintesi di sonde di marcatori ematopoietici e renali .....	50
2.21. Iniezione del morfolino gata1 in uova fecondate.....	51

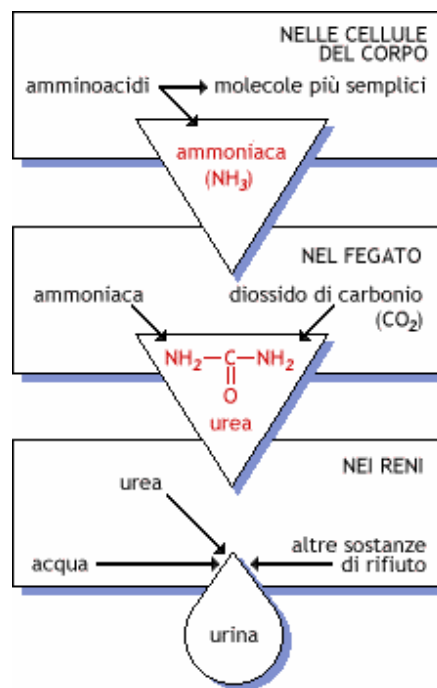
2.22. Clonaggio di <i>soul1</i> in pEGFP/N1 per mRNA.....	52
2.23. Clonaggio di <i>soul1</i> nel vettore pCS2+ per mRNA .....	53
2.24. Clonaggio di <i>soul2</i> nel vettore pCS2+GFP per mRNA .....	54
2.25. Clonaggio di <i>soul2</i> -FlagTag nel vettore pCS2+ per transfezione e mRNA.....	55
2.26. Transfezione di <i>soul2</i> -Flag-pCS2+ in cellule epiteliali umane 293T .....	56
2.27. Immunofluorescenza su cellule.....	56
2.28. Immunoprecipitazione e spettrometria di massa.....	57
2.29. Colorazione dell'emoglobina embrionale con benzidina.....	57
2.30. Esposizione degli embrioni a succinil acetone .....	58
2.31. Purificazione di proteine .....	58
2.32. Saggio Elisa.....	59
2.33. Analisi mediante Western blotting .....	59
2.34. Immunoistochimica.....	60
2.35. Apoptosi .....	60
Tabelle delle soluzioni .....	62
3. RISULTATI .....	69
3.1. Analisi delle sequenze degli ortologi <i>soul1</i> , <i>soul2</i> , <i>soul3</i> e <i>soul4</i> di Zebrafish .....	69
3.2. Analisi dell'espressione degli ortologi <i>soul</i> durante lo sviluppo di Zebrafish .....	78
3.2.1. Profilo di espressione di <i>soul1</i> .....	78

3.2.2. Profilo di espressione di <i>soul2</i> .....	82
3.2.3. Analisi dell'espressione di <i>soul3</i> e <i>soul4</i> .....	85
3.3. Espressione del gene <i>soul2</i> nei morfanti ematopoietici .....	88
3.4. Studi di gain-of-function mediante iniezione di mRNA .....	90
3.5. Studi di loss-of-function mediante iniezione di morfolino .....	92
3.6. Rescue mediante co-iniezione di morfolino ed mRNA .....	96
3.7. Effetti del morfolino sulla produzione di emoglobina .....	96
3.8. Esposizione farmacologia degli embrioni al succinil acetone .....	99
3.9. Localizzazione e funzione del gene <i>soul2</i> .....	100
3.10. Immunoprecipitazione della proteina <i>soul2</i> .....	102
4. Discussione .....	103
5. Bibliografia: .....	109

# 1. Introduzione

## 1.1. Aspetti generali della funzionalità renale

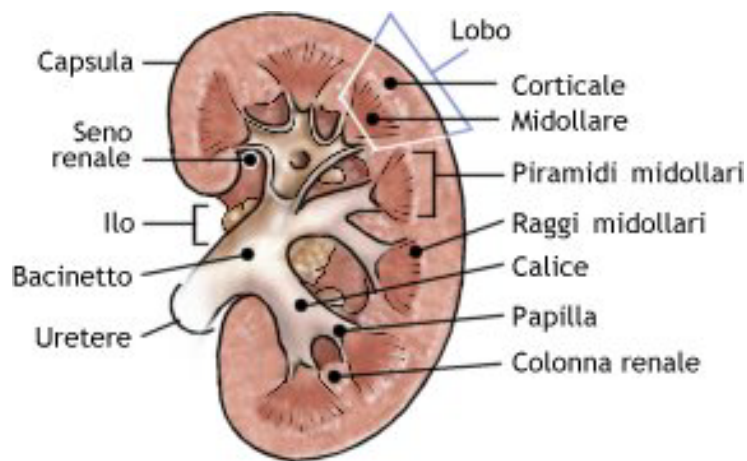
La cellula vivente può essere paragonata a una minuscola fabbrica che richiede un costante afflusso di materie prime e lo smaltimento continuo di sostanze di rifiuto, alcune delle quali risulterebbero tossiche a concentrazioni elevate. Molti rifiuti organici sono rimossi ed escreti dall'apparato urinario. Quest'ultimo svolge diverse funzioni, tra cui l'eliminazione dei prodotti organici di scarto, specialmente i rifiuti azotati come l'urea e l'acido urico, la regolazione della concentrazione plasmatica di sodio, potassio, cloro, calcio ed altri ioni che vengono eliminati con le urine, e della pressione arteriosa attraverso il controllo dell'acqua persa con le urine, la liberazione di ormoni come l'eritropoietina (che stimola la produzione di globuli rossi) e la renina. Inoltre il rene contribuisce alla regolarizzazione del pH ematico, conserva nutrienti preziosi, come il glucosio e gli amminoacidi, che non vengono eliminati con le urine e collabora con il fegato nell'opera di disintossicazione dai veleni. Il sangue trasporta l'ammoniaca al fegato dove viene trasformata in urea, una sostanza molto meno tossica. I reni filtrano dal sangue l'urea che viene eliminata con l'urina, un liquido contenente acqua in cui sono disciolte sostanze di rifiuto e una parte dei nutrienti in eccesso (**Fig. 1**).



**Fig. 1**

### 1.1.1. Struttura del rene dei Mammiferi

Nei mammiferi esistono due reni, in forma di organi ghiandolari compatti, situati nello spazio retro peritoneale, fra i muscoli del dorso e la fascia peritoneale. Ciascun rene ha la forma di un fagiolo, con una parte depressa detta ilo, situata in corrispondenza del margine mediale. Il rene a sviluppo completo presenta due facce, anteriore e posteriore, due margini, laterale e mediale, e due poli, superiore e inferiore. La superficie dell'organo è ricoperta da una densa capsula fibrosa, che ripiega verso l'interno dell'ilo per delineare una cavità interna detta seno renale. I vasi renali e l'uretere fuoriescono dal rene attraverso l'ilo. Il rene può essere suddiviso in una parte esterna, la corticale, ed una più interna, la midollare. Quest'ultima contiene da 6 a 18 strutture coniche dette piramidi, le cui estremità, le papille, si aprono nel seno renale. La sostanza corticale si sistema anche tra le piramidi a costituire le cosiddette colonne renali. All'interno del seno renale si trovano i calici minori in numero pari a quello delle piramidi. Ciascun calice minore ha la forma di un imbuto che circonda la papilla renale. I calici minori confluiscono in tre calici maggiori che fanno capo al bacinetto renale al quale si collega l'uretere (**Fig. 2**).



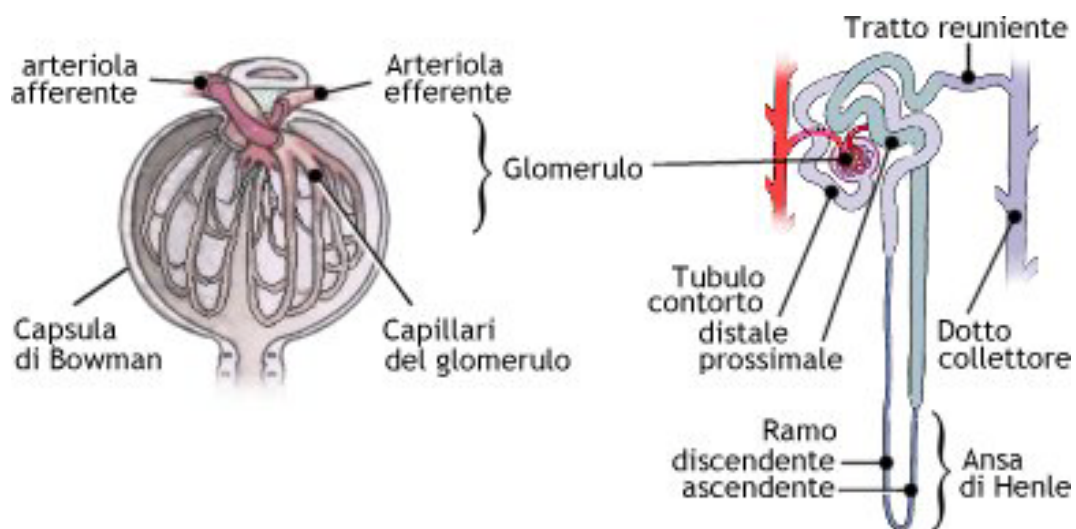
**Fig. 2 Sezione del rene**

L'unità funzionale del rene è il nefrone costituito dal corpuscolo renale e da un tubulo, differenziato in sezioni successive, e che si immette nei tubuli collettori.

I corpuscoli renali costituiscono formazioni sferiche delle dimensioni di 0,2-0,3 mm, prevalentemente costituita da una rete capillare a gomito, il glomerulo, attraverso il quale la parte liquida del sangue viene filtrata da una struttura a forma di calice, la capsula di Bowman, che raccoglie il filtrato e rappresenta l'inizio a fondo cieco del sistema tubolare. Nel corso dell'evoluzione questa parte, che costituisce con il tubulo contorto prossimale, si è dilatata e ha circondato il glomerulo. Ne è risultata una struttura dotata di doppia parete, il cui foglietto interno è strettamente in rapporto con l'endotelio capillare del glomerulo. Le cellule epiteliali di tale strato della capsula di Bowman si sono trasformate nei tipici podociti (cellule fornite di pedicelli), tra i cui prolungamenti, l'acqua e le piccole molecole solubili vengono filtrate dal glomerulo passando quindi nel sistema tubolare. Il liquido filtrato è denominato filtrato glomerulare o preurina. Il corpuscolo renale possiede, quindi, un polo vascolare nell'unico punto che non risulta circondato dalla capsula di Bowman (sbocco e origine dei vasi afferenti ed efferenti) nonché un polo urifero situato sul lato opposto, che costituisce l'inizio del sistema tubolare e che comunica con lo spazio compreso tra i foglietti parietale e viscerale della capsula, detto camera glomerulare. Il sangue, rimasto



nell'arteriola efferente dal glomerulo, a questo punto è molto "concentrato", contenendo una modesta quantità di acqua con relativi soluti e particelle troppo voluminose per superare la barriera delle pareti dei capillari, come globuli rossi e bianchi, grosse proteine e goccioline di grasso. Oltre il glomerulo l'arteriola efferente si ramifica nuovamente in altri capillari, che si attorcigliano e si intrecciano in una rete attorno al tubulo, consentendo il riassorbimento dal filtrato delle sostanze utili, che vengono re-immesse nel circolo sanguigno; le sostanze di rifiuto, invece, rimaste nel sangue dopo la filtrazione, vengono trasferite nel filtrato per essere eliminate (**Fig. 3**).



**Fig. 3 Corpuscolo renale (sx) e nefrone (dx)**

Il tubulo renale in direzione prossimo distale comprende il tubulo prossimale, l'ansa di Henle (che discende nella sostanza midollare) ed infine il tubulo distale, che si immette nel dotto collettore. Attraverso i capillari glomerulari circa 200 Lt di filtrato glomerulare raggiungono giornalmente la camera glomerulare ed il 99% di tale liquido deve rientrare nel torrente sanguigno. Il nefrone, infatti, restituisce al sistema circolatorio i materiali utili e quasi tutta l'acqua, trattenendo le scorie che dovranno essere eliminate. Tale compito è affidato ai tubuli renali e si realizza tramite due meccanismi: il riassorbimento tubolare e la secrezione tubolare.

Durante il primo meccanismo, le cellule del tubulo prossimale riassorbono

normalmente il 60% del volume di filtrato prodotto nel corpuscolo renale. Il sodio viene assunto attivamente, in un processo che comporta dispendio di energia; dalle cellule tubolari, viene trasportato attraverso il citoplasma e rilasciato sul versante opposto in corrispondenza della membrana basale dove viene immesso nei capillari peritubulari. Il trasporto attivo del sodio è centrale rispetto a tutti gli altri meccanismi di riassorbimento: con la fuoriuscita del sodio dal lume si stabilisce una differenza di pressione osmotica fra lume e sangue, cui segue una fuoriuscita di acqua dal lume tubulare. Il trasporto attivo del sodio è allo stesso tempo il presupposto per il riassorbimento degli zuccheri, degli amminoacidi e di altre sostanze organiche, in quanto questi elementi possono penetrare nella cellula solo se legati ad esso.

Durante la secrezione tubulare, la composizione ed il volume del filtrato cambiano sostanzialmente nel tragitto dallo spazio capsulare al tubulo contorto distale. Circa il 60% di acqua ed il 65% dei soluti sono riassorbiti ed un altro 29% di acqua e 25% di sostanze disciolte, soprattutto ioni sodio e cloro, penetrano nel liquido peritubulare della midollare lungo l'ansa di Henle. Il riassorbimento selettivo o la secrezione, in particolare lungo il tubulo contorto distale, mettono a punto poi l'aggiustamento definitivo della composizione del filtrato. La filtrazione non spinge tutte le sostanze disciolte fuori dal plasma, ed il sangue circolante nei capillari peritubulari contiene ancora una certa quantità di sostanze potenzialmente pericolose. In genere la loro presenza non è significativa, perché le restanti concentrazioni sono troppo basse per determinare problemi fisiologici. Se la concentrazione di ioni o componenti specifici nei capillari peritubulari resta troppo elevata, i tubuli possono attivare una secrezione attiva di queste sostanze all'interno del filtrato. Maggiore è la concentrazione, maggiore sarà la secrezione.

### **1.1.2. Sviluppo e nefrogenesi del rene di Mammiferi**

Durante lo sviluppo dei vertebrati superiori si formano, in successione cranio-caudale, a partire dal mesoderma intermedio (IM) tre abbozzi renali: il pronefro, il rene più anteriore e primitivo; il mesonefro, il rene embrionale dei mammiferi e definitivo di pesci e anfibi; e il metanefro, il rene definitivo di mammiferi e

uccelli. Ciascun rene è costituito dai nefroni che condividono tre parti: un glomerulo per la filtrazione del sangue, un tubulo che riassorbe e secerne soluti, ed un dotto collettore che trasporta il filtrato modificato all'esterno. Nei mammiferi e negli altri amnioti, il pronefro e il mesonefro esistono come strutture transienti: una serie di nefrotomi costituiti dalle cellule mesenchimali a livello dei somiti cervicali formeranno il pronefro, mentre quelli del tratto toraco-lombare formeranno il mesonefro. Mentre il pronefro costituisce un organo che non è mai funzionante nei mammiferi, il mesonefro funziona durante la vita fetale. Tuttavia, entrambe le strutture coinvolgono nel corso dello sviluppo, per essere sostituite dal metanefro. Il metanefro si forma all'estremità caudale del dotto mesonefrico, da un'evaginazione nota come gemma ureterica, che interagisce con il mesenchima metanefrico adiacente ed è sottoposto a un elaborato processo di ramificazione morfogenetica (Dressler, 2006). Questa ramificazione della gemma ureterica, genera un sistema di dotti collettori all'interno del mesenchima metanefrico, nel quale in conseguenza alcune cellule si aggregano e subiscono una conversione epiteliale per formare delle vescicole che, successivamente, si svilupperanno in nefroni. Le rimanenti cellule mesenchimali metanefriche costituiranno una popolazione stromale con un ruolo essenziale durante la regolazione della ramificazione della gemma ureterica. La conseguente proliferazione e l'allungamento delle vescicole metanefriche darà vita a una struttura tubulare a forma di "S", che si modellerà lungo il proprio asse prossimo-distale per generare la capsula di Bowman con i podociti, a livello del glomerulo, seguita da un tubulare con un epitelio differenziato in segmenti ben specializzati. Questi segmenti includono i tubuli convoluti prossimali e distali; i rami ascendente e discendente, e l'ansa di Henle (nota anche come tubulo intermedio). L'estremo distale di questo tubulo si immette in tubuli collettori derivati dalla gemma ureterica e quindi nel dotto collettore (Hebert et al., 2001; Reilly et al., 2000; Jacobson, 1981).

## **1.2. Sviluppo e nefrogenesi del rene di *Zebrafish***

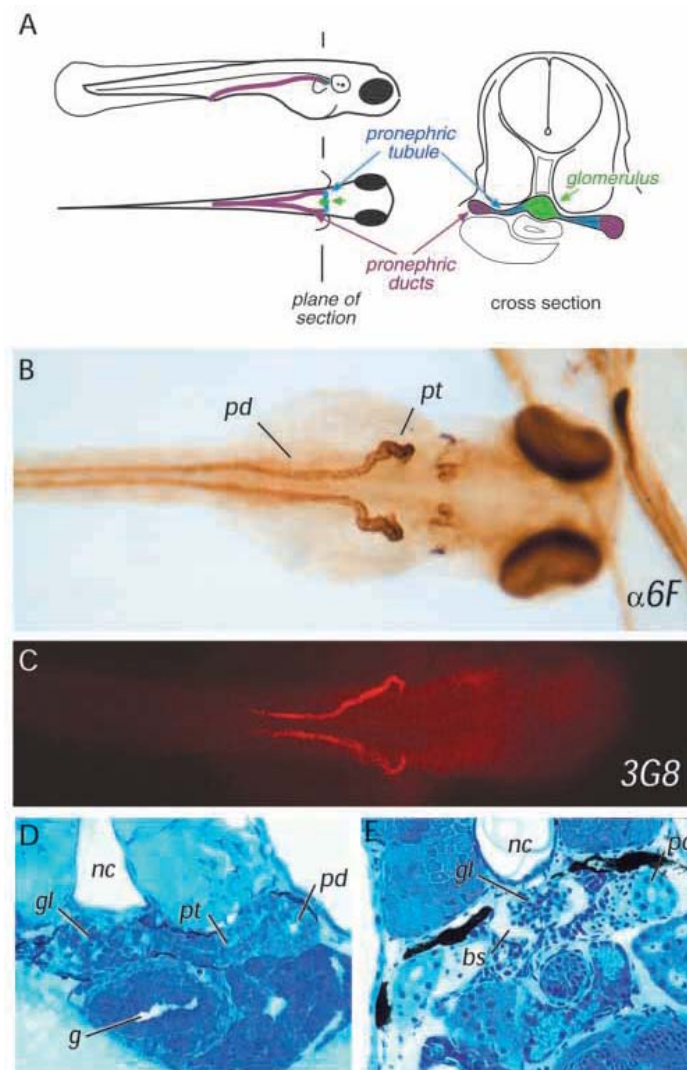
Nei vertebrati inferiori, come pesci e anfibi, il rene pronefrico è funzionale e

comprende un paio di nefroni bilaterali che derivano dai nefrotomi del pronefro e funzionano durante la vita embrionale e larvale. Il mesonefro si sviluppa solo più tardi, durante la vita larvale, con la formazione di più nefroni indotti dal mesenchima mesonefrico e che costituiscono il rene definitivo. In particolare, durante lo sviluppo embrionale dei pesci si forma un unico rene, costituito da due nefroni che derivano dalle due componenti bilaterali del mesoderma intermedio pronefrico (Drummond, 2003; Drummond et al., 1998). Le cellule anteriori danno vita ai podociti che migrano verso la linea centrale e reclutano le cellule endoteliali per formare un unico glomerulo vascolarizzato comune ai due nefroni (Drummond et al., 2003; Drummond et al., 1998; Serluca et al., 2001; Majumdar et al., 1999; Majumdar et al., 2000). Il restante mesoderma intermedio subisce una transizione mesenchimale - epiteliale per formare un epitelio tubulare che si fonde con la cloaca, comune sia all'intestino sia al pronefro per eliminare i prodotti di rifiuto all'esterno (Zhou et al., 2005; Hostetter et al., 2003; Drummond et al., 1998). L'analisi dei tipi cellulari differenziati nel pronefro dei pesci ha mostrato molte similitudini con quelle del metanefro dei mammiferi. Le cellule endoteliali di tipo vascolare sono fenestrate e i podociti sono simili a quelli del rene dei mammiferi (Drummond, 2003; Drummond et al., 1998). Queste caratteristiche insieme alla semplicità di organizzazione del tubulo, ha reso il rene dei pesci, un ottimo modello per lo studio della fisiologia e dei disordini renali.

Nello *Zebrafish*, il primordio pronefrico inizia a essere evidente durante la somitogenesi iniziale come una massa del mesoderma intermedio che si estende sotto il secondo e il terzo somite (Kimmel et al., 1995). Da questa posizione su entrambi i lati dell'embrione, i dotti pronefrici sviluppano in direzione caudale. Dalle 24 hpf (hours post fertilization), i dotti sono costituiti da tubuli epiteliali aperti, che si fondono caudalmente e confluiscono fuori dall'embrione attraverso l'apertura urogenitale. Studi morfologici in diverse specie di pesci suggeriscono che i primordi del nefrone siano presenti nella porzione rostrale dei dotti pronefrici e che diano origine ai glomeruli e ai tubuli pronefrici (Armstrong, 1932; Newstead and Ford, 1960; Agarwal and John, 1988; Tytler et al., 1996). Il pronefro di un embrione di *Zebrafish* di 2 – 3 giorni è relativamente semplice ed è

costituito da una coppia di nefroni, uniti all'estremità anteriore da un glomerulo centrale deputato alla filtrazione del sangue. Nonostante la forma semplice, il glomerulo pronefrico è composto di tipi cellulari caratteristici dei reni nei vertebrati superiori, includendo, cellule endoteliali fenestrate in ciuffi capillari e podociti con processi estesi a formare una sorta di reticolo attorno ai capillari.

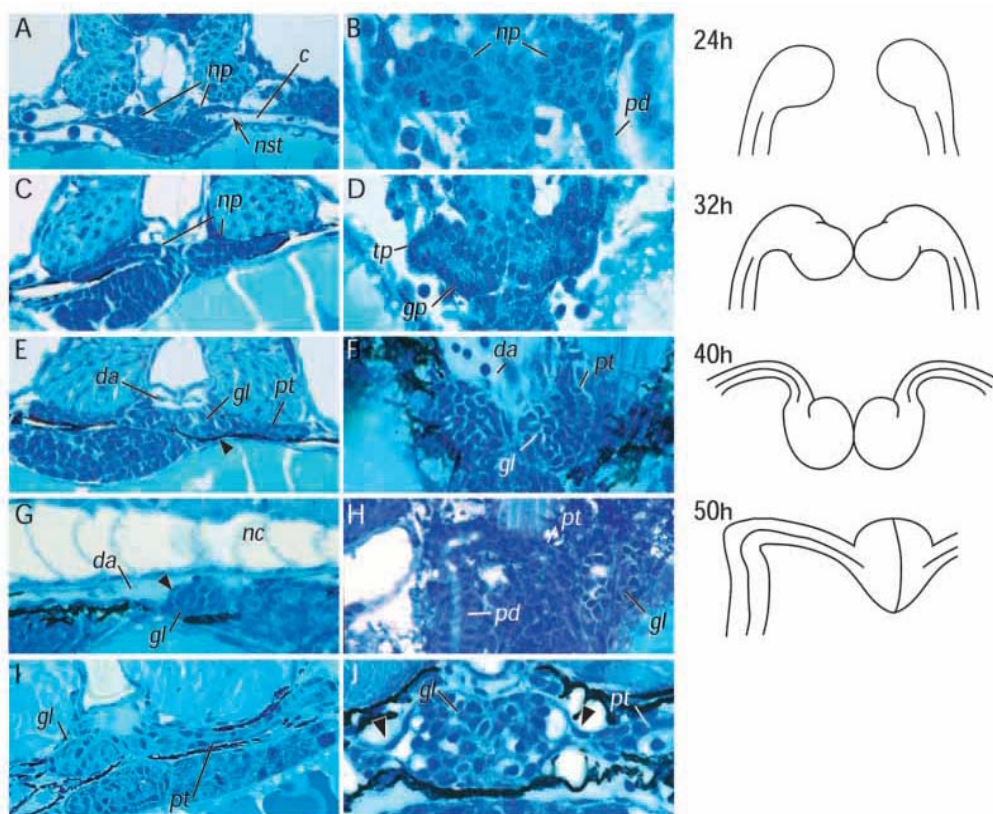
I tubuli pronefrici collegano il glomerulo ai dotti pronefrici che si estendono caudalmente e si fondono poco prima del loro contatto con la cloaca. Il rene pronefrico si forma attraverso una serie di passaggi che comprendono l'addizione sequenziale di questi tre elementi: i primi a formarsi sono i dotti pronefrici il cui sviluppo si completa dopo 24 hpf. I tubuli si differenziano leggermente più tardi tra le 30 e le 40 hpf, mentre il glomerulo comincia a filtrare il sangue a partire dalle 48 hpf. A 72 hpf è possibile osservare l'intero sistema renale pronefrico (*Fig. 4*).



**Fig. 4 Pronefro di Zebrafish**

Allo stadio di 24 hpf il primordio del nefrone, posizionato ventralmente al terzo somite (**Fig. 5A,B**), appare come una piega dell'epitelio celomico, con un'apertura ben visibile (**Fig. 5A**). Quest'apertura verso il celoma potrebbe essere considerata l'equivalente del nefrostoma, già osservato in altre specie di pesci e nel pronefro maturo degli anfibi (Goodrich, 1930; Armstrong, 1932). In sezioni sagittali, il primordio del nefrone pronefrico appare come un gruppo di cellule a forma di disco in cui non sono morfologicamente evidenti tubuli o glomeruli (**Fig. 5B**). L'esterno anteriore dei dotti pronefrici è adiacente ai margini laterali dei primordi del nefrone (**Fig. 5B**). Dalle 32 – 33 hpf, la separazione dal celoma è completa e il

primordio del nefrone appare come un gruppo di cellule distinte e separate, senza alcuna connessione con la cavità del corpo (*Fig. 5C,D*), organizzate in una serie di vescicole. I primi segni morfogenetici di un rene pronefrico sono costituiti dalla presenza nel primordio di domini laterali e mediali nelle regioni che costituiranno i futuri tubuli e glomeruli (*Fig. 5D*). A 40 hpf, è finalmente evidente la distinzione morfologica tra le cellule della linea mediana e quelle che si estendono più lateralmente, adiacenti all'estremo anteriore del dotto pronefrico (*Fig. 5E*). Le cellule della regione si organizzano in una struttura a fondo cieco o capsulare, mentre le cellule laterali cominciano ad assumere la forma tipica dei tubuli pronefrici (*Fig. 5E*). La porzione a fondo cieco costituisce le presuntive cellule della capsula che appaiono in stretto contatto con il presuntivo glomerulo e la sovrastante aorta dorsale (*Fig. 5G*). Dalle 50 hpf, le superfici mediali dei due primordi glomerulari si sono fuse sulla linea mediana mentre i due tubuli pronefrici, che li abbracciano, si collegano ai dotti pronefrici bilaterali. Dalle 60 hpf (*Fig. 5I*) in poi (*Fig. 5J*), la formazione del nefrone è praticamente completa e la connessione diretta tra la capsula di Bowman e il lumen dei tubuli pronefrici è evidente.



**Fig. 5 Morfologia del pronefro**

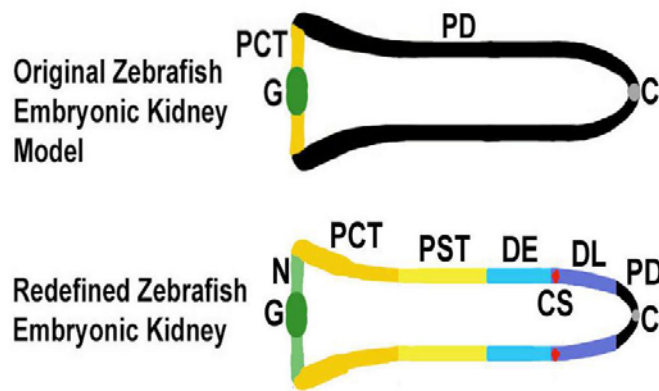
Da quest'analisi istologica è facilmente deducibile che dopo la separazione dei due nefroni primordiali dal celoma, ciascun nefrone pronefrico si differenzia come un gruppo integrato di cellule a formare un sistema pronefrico chiuso, con un paio di tubuli bilaterali che andranno a unirsi direttamente con i glomeruli.

### **1.2.1. Basi molecolari dello sviluppo del pronefro in *Zebrafish***

La scoperta di meccanismi molecolari che controllano lo sviluppo renale è stata possibile attraverso l'identificazione di una serie di geni, tra cui 15 trasportatori di soluti, espressi in specifiche regioni del pronefro di *Zebrafish*, a partire dallo stadio di 5 somiti fino alle 144 hpf (Wingert et al., 2007). Questo ha permesso la visualizzazione di 8 regioni distinte del pronefro, con alcuni geni espressi in più di una regione. Molti di questi geni sono risultati ortologhi di geni espressi nel metanefro dei mammiferi, e, inoltre, rappresentano definiti segmenti del nefrone.



Ad esempio *slc9a3* è espresso nei podociti e nel segmento convoluto (PCT) e dritto (PST) prossimale (**Fig. 6**) (Biemesderfer et al., 1993); *slc20a1* è espresso in tutto l'epitelio del nefrone, anche se in maniera più rilevante nel tubulo prossimale. Trascritti di *slc13a3* sono osservabili nel PST (Chen et al., 1999), mentre l'attività del gene *slc12a1* è ristretta alla macula densa (MD) (Nielsen et al., 1998; Schmitt et al., 1999). Il gene *slc12a3* è espresso nel tubulo convoluto distale (PST) (Schmitt et al., 1999) e *gata3* marca specificamente il dotto collettore (CD). Attraverso questo confronto tra geni espressi nei mammiferi e *Zebrafish*, è stato possibile rinominare i segmenti del pronefro, partendo dalla regione prossimale a quella distale, in: podociti (pod), collo (N), tubulo convoluto prossimale (PCT), tubuli prossimali retti (PDT), tubulo distale precoce (DE), corpuscolo di Stannius (CS), tubulo distale tardivo (DL) e dotto pronefrico (PD) (**Fig. 6**).

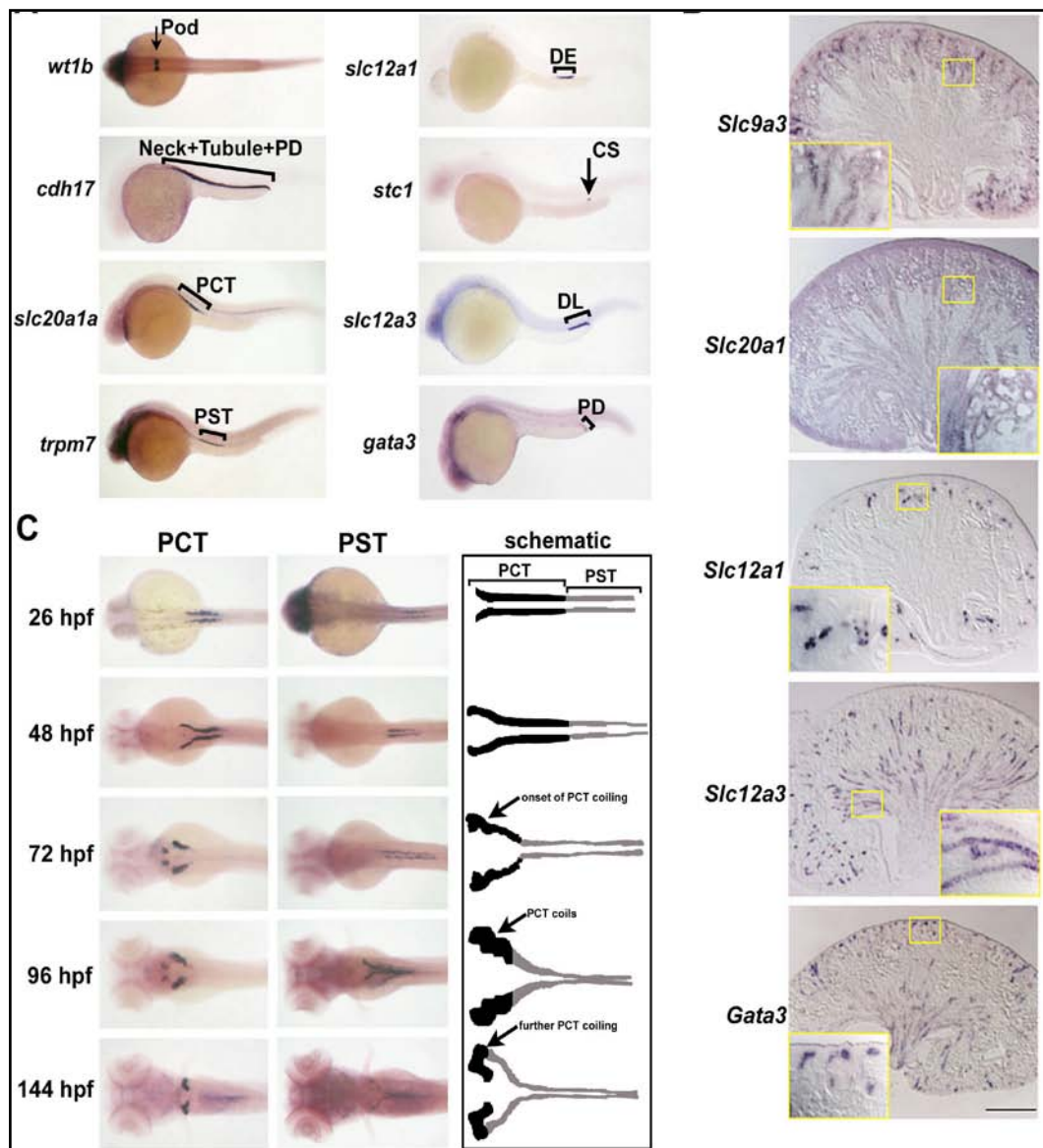


**Fig. 6 Segmentazione del pronefro di Zebrafish**

La divisione del tratto iniziale del tubulo in PCT e PST è basata sull'espressione di *slc20a1a* nelle cellule del PCT, la cui morfogenesi trasforma, a partire dai 5 giorni dopo la fecondazione (dpf), l'iniziale tubo lineare in una struttura a forma di spirale, mentre l'espressione di *trpm7* e *slc13a1* nel segmento PST ne evidenzia la struttura lineare. Inoltre, l'espressione discontinua di *trpm7* e *slc13a1* nel PST suggerisce la presenza di due tipi cellulari: cellule multiciliate ed epitelio di

trasporto (Ma et al., 2007; Lyu et al, 2007).

Tra le 24 e le 48 hpf, quando ha inizio la filtrazione del sangue, i pronefri sono sottoposti a una significativa riorganizzazione morfogenetica, con la migrazione verso la linea mediana dei podociti e la crescita ed allungamento dei tubuli (Drummond, 2003). A 24 hpf, i progenitori dei podociti e del collo sono disposti in un'esile curva a livello del terzo-quarto somite, con il limite anteriore del tubulo convoluto prossimale a livello del quinto somite. Dalle 48 hpf, i progenitori dei podociti si fondono alla linea mediana, a livello del terzo somite, e la presuntiva regione del collo, che forma un'estensione laterale, si collega con il tubulo convoluto prossimale, situato anch'esso a livello del terzo somite. Durante questo tempo, la lunghezza dei segmenti, costituiti dai tubuli convoluti e dritti prossimali e del tubulo precoce distale, aumenta, probabilmente a causa della divisione cellulare di ciascun segmento. Questa crescita potrebbe essere la fonte di forza responsabile dello slittamento dal quinto al terzo somite del limite anteriore del tubulo convoluto prossimale, tra le 24 e le 48 hpf, e della formazione del groviglio morfogenetico del tubulo convoluto prossimale tra le 72 e le 144 hpf. Al contrario, il segmento del tubulo precoce distale non subisce variazioni di lunghezza tra le 24 e le 48 hpf, ad indicare che non ci sono espansioni uniformi di tutti i segmenti durante lo sviluppo. Dopo le prime due, tre settimane, il tubulo tardivo distale si presenta proporzionalmente più largo degli altri segmenti, suggerendo che la sua espansione è predominante negli stadi più tardivi dello sviluppo. E' interessante notare che, a 24 hpf, la sovrapposizione del tubulo tardivo distale e del dotto pronefrico a livello del diciassettesimo somite, indica la presenza di un ulteriore segmento, probabile equivalente del dotto collettore dei mammiferi (**Fig. 7**), (Wingert et al., 2007).



**Fig. 7** *Espressione genica del pronefro di Zebrafish e del metanefro dei mammiferi*

Al fine di mappare i cambiamenti morfologici tra le 24 e le 48 hpf, sono stati analizzati i diversi livelli di espressione di alcuni geni all'interno dei vari segmenti. E' stato così dimostrato che, ad esempio, alcuni trasportatori di soluti, come, *slc13a1* (inorganic sulphate transporter), *slc13a3* (sodium-dicarboxylate carrier) e *slc22a6* (organic anion transporter) non sono espressi prima delle 48hpf; che *trpm7* (divalent cation-selective ion channel) e *slc41a1* (Mg 2p transporter)

iniziano a marcare le cellule del CS a 48 hpf. Queste osservazioni evidenziano come la maturazione degli epiteli dei segmenti avvenga solo in seguito all'inizio della filtrazione del sangue, in *Zebrafish* intorno alle 40 hpf (Drummond et al., 1998; Majumdar et al., 2000), e ben prima che il glomerulo sia completamente maturo (4 dpf).

Di seguito sono descritti alcuni geni nefrogenici ed ematopoietici utilizzati come marcatori in questo studio:

### ***Ret1***

Il gene *c-ret* proto-oncogene è un membro della superfamiglia dei recettori tyrosine kinase che gioca un ruolo essenziale durante lo sviluppo del sistema escretorio e del sistema nervoso enterico e autonomo dei mammiferi. Il recettore *ret* possiede un dominio ricco in cisteina nella regione C-terminale del dominio extracellulare e 23 cisteine residue che sono conservate in *Zebrafish*. (Gutiérrez et al., 1997). La funzione del locus *c-ret* è stata studiata nei vertebrati inferiori e il suo omologo *ret1* è stato isolato in *Zebrafish*. Il profilo di espressione durante l'embriogenesi ha mostrato la presenza dell'mRNA del gene *ret1* durante la somitogenesi iniziale in quello che è il presunto sistema nervoso, nella corda spinale e nel sistema escretorio. Questi dati hanno rivelato una sostanziale similitudine di espressione di *c-ret* nei vertebrati superiori e inferiori che ha suggerito che la funzione di questo locus è conservata nell'evoluzione dei vertebrati. Bisgrove et al. (1997) hanno individuato l'espressione del trascritto di *c-ret* in numerosi tessuti, incluso i motoneuroni spinali, i dotti pronefrici, i gangli craniali, gli archi faringei e il sistema nervoso enterico durante lo sviluppo di *Zebrafish*. *C-ret* gioca un ruolo importante nella specificazione delle cellule CaP e del destino cellulare a partire dall'espressione di geni cellule specifici come *islet2*.

### ***Gata3***

Il fattore di trascrizione *gata3* è uno dei sei membri di una famiglia di fattori di trascrizione che lega il motivo consenso A/TGATAA/G e che regola i passi critici del differenziamento durante lo sviluppo embrionale (Tsai et al., 1994; Pandolfi et

al., 1995; Kuo et al., 1997). *Gata3* è prevalentemente espresso nei precursori delle cellule linfoidee ed è implicato nel differenziamento dei linfociti T. Esperimenti di ibridazione *in situ* su embrioni di uomo e topo, hanno mostrato un'elevata conservazione di *gata3* durante lo sviluppo embrionale. In embrioni di uomo il trascritto di *gata3* è stato osservato a partire dalla quarta settimana di gestazione, equivalente allo stadio di 8.5 dpc (days post coitum), in cui il gene è stato ugualmente osservato nel tubo neurale, nell'endoderma dell'intestino e nel dotto di Wolffian. Grote et al. (2005) hanno inoltre dimostrato che *gata3* è un regolatore chiave della morfologia del dotto nefrico e del passaggio a rene pro/mesonefrico. In *Zebrafish* l'omologo di *gata3* di topo è stato isolato e il trascritto è stato osservato nel segmento del PD, regione analoga al dotto collettore di topo in cui il gene è espresso (Wingert et al., 2007).

### ***Slc12a1***

Il trasportatore di soluti *slc12a1* è una proteina di membrana che media il trasporto di sodio, potassio e cloro attraverso la membrana plasmatica ed è rene specifico. Nei mammiferi è stato individuato sulla membrana apicale dell'ansa di Henle e nella macula densa. Simon et al. (1996) hanno isolato la forma predominante di uomo NKCC2 da una libreria di cDNA umano e hanno visto che si tratta di una proteina di 1,099 amminoacidi che mostra una forte similarità di sequenza con NKCC2 di coniglio e ratto (95% e 93%, rispettivamente). Quaggin et al. (1995) notarono che nel rene dei mammiferi, un co-trasportatore di Na-K-Cl, precedentemente chiamato NKCC2, media il riassorbimento attivo di sodio cloride nell'ansa di Henle e che rappresenta il sito di azione di diuretici clinicamente importanti quali la furosenide e la bumetanide. Il gene *slc12a1* in uomo e topo è strutturalmente correlato a un altro co-trasportatore Na-K-Cl, *slc12a2*, che diversamente da *slc12a1* rene specifico, è espresso in diversi tessuti, tra cui la membrana basolaterale dell'epitelio secretorio, dove media la secrezione del cloro. A partire da questi risultati l'ortologo di *Zebrafish* è stato clonato e analizzato attraverso esperimenti di ibridazione *in situ* da cui è emerso che il trascritto è localizzato nella regione del DE del pronefro di *Zebrafish*, regione corrispondente a quella in cui il gene è espresso in topo, suggerendone il grado di

conservazione.

### ***Trpm7***

Si tratta di un membro della famiglia dei canali potenziali recettori transienti (TRP) che sono implicati nel controllo dell'entrata del calcio nella cellula. I canali TRP non mostrano selettività cationica, ma risultano permeabili al  $\text{Ca}^{2+}$ . Contrariamente alle altre proteine TRP, *TRPM7* permeabilizza i cationi divalenti come  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  nella cellula. Il dominio di *TRPM7* è strettamente collegato con il putativo soppressore tumorale, melastatina, suggerendo che la sottofamiglia *TRPM* potrebbe essere il più nuovo gruppo con potenziali ruoli nel signaling del  $\text{Ca}^{2+}$ , nel controllo della progressione del ciclo cellulare e della motilità cellulare. La proteina *trpm7* è stata isolata anche in *Zebrafish* e dall'analisi dell'espressione è stato visto che *trpm7* espresso nel rene mesonefrico e inoltre, attraverso l'utilizzo di mutanti è stato dimostrato che in assenza del gene *trpm7* gli embrioni manifestavano disfunzioni renali.

### ***Hbbe1***

Le globine sono proteine dell'eme che legano e trasportano l'ossigeno. Si tratta di proteine che sono conservate nel corso dell'evoluzione sia nei vertebrati superiori che in quelli inferiori e negli invertebrati.

### ***Tfr1a***

La *transferrina*, una sieroproteina con due siti di legame per il ferro, è uno dei maggiori trasportatori di ferro ferrico nel plasma umano ed è necessario per recapitare il ferro alle cellule eritroidi in crescita e ad altre cellule.

In *Zebrafish* 2 recettori della transferrina dei mammiferi sono stati identificati ed è stato dimostrato che il ruolo biochimico della *tfr1a* di *Zebrafish* per mediare l'acquisizione cellulare del ferro è conservata con le *tfr1s* dei mammiferi. Al contrario, la *tfr1b* di *Zebrafish* non è necessaria per l'eritropoiesi. Piuttosto la funzione della *tfr1b* è indispensabile per la crescita e lo sviluppo dei tessuti non ematopoietici nell'embrione. Queste due funzioni insieme equiparano la funzione

della singola *trf1* dei mammiferi (Wingert et al., 2004).

### ***Gata1***

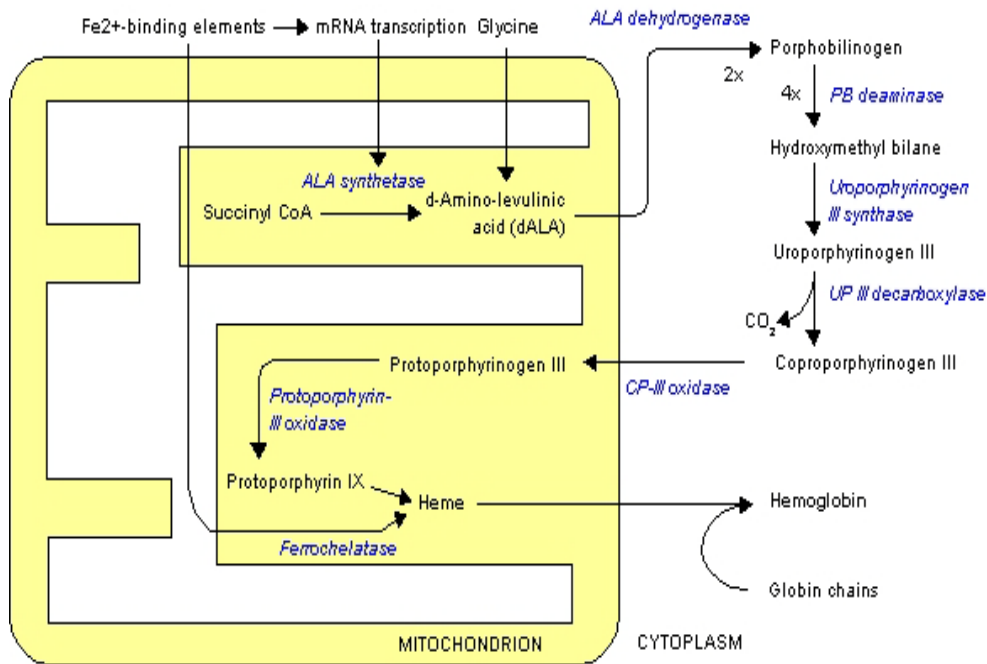
*Gata1* è un fattore di trascrizione necessario per il differenziamento eritroide terminale ed è stato dimostrato che la sua perdita trasforma i primitivi precursori sanguigni in cellule mieloidi (Galloway et al., 2005). Inoltre geni eritroidi non risultano più espressi nei morfanti di *gata1*.

### **1.3. Eme ed ematopoiesi**

L'eme è un complesso chimico, membro di una famiglia di composti, le porfirine, che contengono un atomo di ferro. Esso costituisce la parte non proteica di una serie di proteine, tra cui l'emoglobina, la mioglobina e i citocromi, e deve la sua importanza proprio al fatto che può legare l'ossigeno, sia in forma molecolare che in altri composti, grazie alla presenza dell'atomo di ferro. L'importanza dell'eme dal punto di vista biologico è dovuta alla sua funzione, basata sull'atomo di ferro, che essendo in grado di legare in maniera irreversibile l'ossigeno, lo utilizza per trasportare elettroni nella catena respiratoria, per ridurre specie reattive dell'ossigeno quali catalasi e perossidasi, ma anche semplicemente trasportandolo nel sangue sotto forma di emoglobina, o immagazzinandolo nei muscoli come mioglobina. Un gran numero di malattie sono associate alle deficienze degli enzimi usati nella sua biosintesi.

La sintesi dell'eme ha luogo nel citoplasma e nel mitocondrio della cellula. Il processo enzimatico che produce l'eme va sotto il nome di sintesi porfirinica e gli enzimi che ne fanno parte, sono molto conservati tra le varie specie. Nell'uomo, questa via di sintesi serve quasi esclusivamente a produrre eme; in altre specie serve anche a produrre sostanze simili come la vitamina B12. La sintesi dell'eme ha inizio dalla sintesi di acido (delta)-aminolevulinico dall'amminoacido glicina e dal Succinil-CoA proveniente dal ciclo di Krebs (ciclo dell'acido citrico). L'attività dell'enzima responsabile di questa reazione (Ala sintetasi) è regolata dal livello intracellulare di ferro e dalla concentrazione di eme (**Fig. 8**). Gli organi principalmente coinvolti nella sintesi dell'eme sono il fegato e il midollo osseo,

sebbene tutte le cellule lo richiedano per funzionare bene.



**Fig. 8 Biosintesi dell'eme**

L'eme viene degradato con un processo enzimatico che porta alla formazione della bilirubina, un potente agente antiossidante, in particolare quello dei globuli rossi viene degradato nella milza. Difetti degli enzimi responsabili della sintesi o della degradazione dell'eme sono responsabili di disordini ereditari o acquisiti, tra cui anche gravi alterazioni del rene, chiamati porfirie, un gruppo di malattie rare, per la maggior parte ereditarie, dovute ad un'alterazione dell'attività di uno degli enzimi che sintetizzano il gruppo eme nel sangue.

Nei vertebrati, le cellule ematopoietiche derivano da cellule staminali multipotenziali autorinnovabili la cui specificazione avviene precocemente durante lo sviluppo del mesoderma ventrale. L'induzione è dipendente da una cascata di fattori BMP (bone morphogenetic proteins) (Zon et al., 1998). Le



cellule risultanti possono avere sia un'attività ematopoietica che vascolare. L'ematopoiesi coinvolge la proliferazione cellulare e il differenziamento che porterà alla formazione di cellule con diverso destino.

Nello *Zebrafish* l'ematopoiesi ha luogo durante la gastrulazione precoce, in strisce bilaterali di mesoderma che convergono nel tronco posteriore e nella coda (Al-Adhami et al., 1977; Davidson et al., 2004). Queste regioni del mesoderma parassiale note come Intermediate Cell Mass (ICM) sono corrispondenti al sito di localizzazione extraembrionale dei progenitori ematopoietici dei vertebrati superiori. Questa regione contiene almeno 300 pro-eritroblasti che esprimono i geni necessari alla sintesi dell'eme e delle globine.

A 20 hpf le due componenti mesodermiche si fondono in un'unica regione ematopoietica intra-embrionale, localizzata tra la notocorda e l'endoderma, che contiene due subpopolazioni di progenitori dei globuli rossi esprimenti diversi markers molecolari: una sub-popolazione più differenziata derivante dall'ematopoiesi primitiva, che esprime i fattori di trascrizione ematopoietici *gata1*, *gata2* e *scl*, che è localizzata nella zona anteriore della ICM (A-ICM), e una seconda sub-popolazione di precursori eritroidi, che esprime solo *gata2* e *scl*, localizzata nella ICM posteriore (P-ICM).

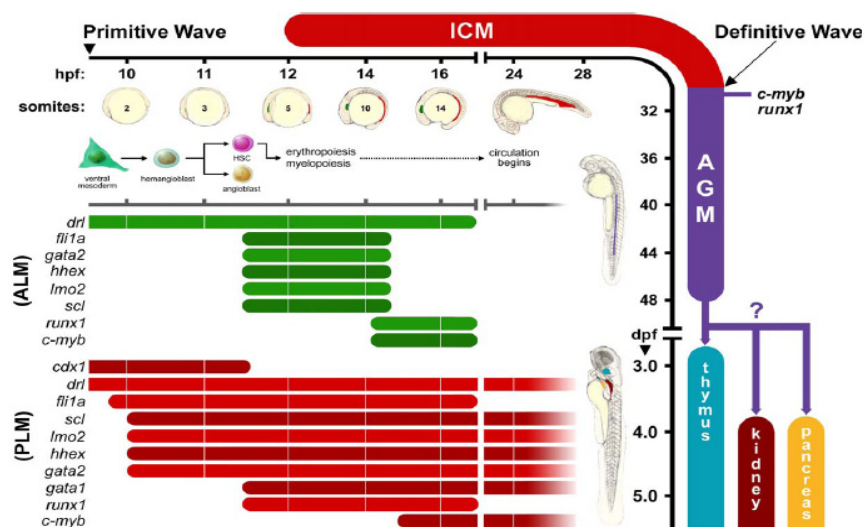
Allo stadio di 25 somiti, ha inizio la biosintesi dell'eme nei mitocondri. I progenitori degli eritrociti embrionali primitivi si sviluppano fino allo stadio di pro-eritroblasti e sono rilasciati nella circolazione a 48 hpf. Tuttavia, solo le cellule dell'A-ICM entreranno in circolazione, mentre quelle provenienti dalla P-ICM rimarranno localizzate nell'area mesodermica. I progenitori A-ICM andranno a insediarsi nelle nicchie ematopoietiche che daranno origine al sangue definitivo.

Lo sviluppo continua nei cinque giorni successivi, periodo durante il quale queste cellule sono sottoposte simultaneamente ad una seconda ondata di differenziamento, da cui si formano gli eritrociti embrionali.

I precursori cellulari che portano all'ematopoiesi definitiva e alle linee di differenziamento a lungo termine, emergono da un dominio intracellulare che in *Zebrafish* corrisponde alla parete ventrale dell'aorta dorsale, mentre nei vertebrati

superiori è chiamato AGM (Aorta-Gonad-Mesonephros), le cui cellule staminali vanno a popolare il fegato e la milza fetali (Davidson et al., 2004) (**Fig. 9**). Le prime cellule ematopoietiche compaiono nel pronefro a 4 dpf, si organizzano in cordoni cellulari che circondano i vasi sanguigni tra i tubuli ed i glomeruli renali. Con la formazione dei tubuli renali addizionali, comprendenti il mesonefro, la quantità di tessuto ematopoietico nel rene aumenta (**Fig. 9**).

Infine il rene mesonefrico dell'animale adulto è attivo per quanto riguarda l'ematopoiesi, e presenta una complessità cellulare paragonabile al midollo osseo dei mammiferi.



**Fig. 9 Ematopoiesi**

### 1.3.1 Malattie renali ed ematopoietiche

L'omeostasi del ferro è mantenuta dalla regolazione meticolosa dell'assorbimento di quest'ultimo dall'intestino. L'assorbimento del ferro è modulato sia in risposta al livello del ferro immagazzinato e sia all'ammontare del ferro necessario all'eritropoiesi. La piccola quota di ferro perduta giornalmente deve essere ricostituita per mantenere l'omeostasi. Se ciò non avviene, o perché le perdite sono eccessive, o perché la quantità di ferro assorbita è insufficiente, si sviluppa uno

stato di carenza di ferro che, con il tempo, porterà allo sviluppo dell'anemia, perché senza ferro non può essere prodotta l'emoglobina. Inoltre, si riconoscono diversi difetti legati al malfunzionamento dei geni delle globine, che danno origine alla talassemia, malattia molto comune in Italia e nel bacino mediterraneo. La deficienza di ferro può anche essere provocata da un raro difetto ereditario nell'assorbimento del ferro, ma i geni responsabili di questa malattia non sono ancora stati identificati. In condizioni di deficienza del ferro, i precursori degli eritrociti hanno la priorità nell'utilizzo di quest'ultimo, e la produzione di globuli rossi continua a discapito degli altri tessuti. L'eritropoiesi sarà limitata quando i depositi di ferro saranno esauriti (Andrews, 1999 - 2000).

Viceversa il ferro in eccesso lentamente si accumula nell'organismo, in particolare, nel fegato, e successivamente nei miocardiociti, nelle cellule acinose del pancreas, determinando l'apparizione di sideroblasti. L'eccesso di ferro è quasi sempre causata da una tendenza ereditaria ad assimilare troppo ferro. Nel complesso quadro di meccanismi che intervengono nel trasporto del ferro si ritiene che al ciclo del ferro legato alla transferrina (TBI) devono affiancarsi altri meccanismi di importo ed esporto del ferro non legato alla transferrina (NTBI). Infatti topi ipotrasferrinici, e umani attrasferrinici, hanno dei disturbi severi nell'ematopoiesi ma sono comunque vitali. L'NTBI è di solito presente in livelli importanti negli organismi che presentano un sovraccarico di ferro. In questo caso l'eritropoiesi continua normalmente (Andrews, 1999 - 2000). Esistono anche difetti a carico dell'eme, che si realizzano in una malattia che va sotto il nome di porfiria (Wang et al., 1998).

Una delle malattie genetiche umane che colpisce fino a 1000 individui l'anno, in particolare negli USA, è quella del rene policistico (Calvet et al., 2001). Le cisti renali sono il risultato dell'allargamento dei lumi del tubulo renale e quando si presentano in grosso numero e dimensioni, portano alla fibrosi renale e quindi al fallimento della funzione renale. Recentemente, i risultati di uno screening mutazionale su larga scala, ha identificato dieci geni in *Zebrafish* che, quando mutati, causano cisti renali (Sun et al., 2004). L'esigenza di un ampio numero di geni, necessari per mantenere la struttura del tubulo, è in accordo con l'idea che il mantenimento della grandezza del lume del tubulo e delle cellule epiteliali che lo

compongono, è un complesso processo controllato da diverse proteine cellulari. Altri difetti renali comuni a tutti i vertebrati riguardano la formazione dei glomeruli e le sindromi nefroniche. In alcune forme patologiche, vi è un aumento della permeabilità dei glomeruli a diverse molecole, che può determinare proteinuria, cioè alla presenza di proteine nelle urine oltre una certa soglia. Questo difetto è stato osservato anche in mutanti di *Zebrafish*, rendendoli oggetto di studio per il trattamento di questa patologia umana.

Nonostante alcune differenze morfologiche tra il rene dei mammiferi e quello dei teleostei, esistono dei parallelismi a livello cellulare e molecolare che possono essere sfruttati per meglio capire lo sviluppo del rene e i suoi difetti congeniti. Gli stessi geni e tipi cellulari sono usati durante lo sviluppo embrionale e per la funzione renale, in tutti i vertebrati. Infatti geni mutati durante le malattie renali dei mammiferi, sono essenziali quelle per la formazione e la funzione del pronefro di *Zebrafish*, il che fa di questo organismo un modello rilevante per studi inerenti lo sviluppo e le patologie renali.

#### **1.4. I geni *Soul***

Tra le proteine che legano l'eme e partecipano al suo metabolismo, il ruolo dei fattori appartenenti alla famiglia *Soul* in questo processo è ancora poco conosciuto. Partendo da studi sulla biosintesi dell'eme, il gruppo di Taketani (1998) identificò una proteina di ventidue kDa, estratta dal fegato di topo e denominata p22HBP. Questa proteina non mostrava avere omologia di sequenza con le altre proteine che legano l'eme (HBP). Tuttavia, l'espressione ubiquitaria dell'RNA messaggero di p22HBP in vari tessuti e in particolare nel fegato, sito principale della sintesi di eme, ne suggeriva un possibile coinvolgimento nel legare l'eme. Successivamente, uno studio sui geni coinvolti nella generazione del ritmo circadiano, permise di scoprire un gene omologo di p22HBP, il cui trascritto è presente nella retina e nella ghiandola pineale di pollo (Zylka e Reppert, 1999). La proteina fu battezzata col nome di *Soul*, in virtù dell'attività trascrizionale nella ghiandola pineale, sede dell'anima secondo Cartesio (Descartes, 1649). Studi biochimici e su colture cellulari di p22HBP e *Soul* indicano che esse agiscono da amplificatore citosolico per l'eme e le porfirine, contro l'intossicazione delle

cellule da parte dei prodotti del ferro. Con gli omologhi di p22HBP e *soul* di topo, mHBP ed mSOUL, strettamente correlati tra di loro, è stata costituita una nuova famiglia di proteine denominata SOUL/HBP. A questa famiglia è stato attribuito un coinvolgimento nel trasporto del coproporfirinogeno verso i mitocondri, e dell'eme citosolico. Tuttavia, il gruppo di Blackmon (2002) ha dimostrato che p22HBP di uomo e topo, pur presentando un'elevata affinità per molecole mitocondriali quali la protoporfirina, il coproporfirinogeno e la bilirubina, non presenta localizzazione mitocondriale, agendo più come buffer intracellulare che come trasportatore di porfirinogeno.

L'analisi strutturale di p22HBP di topo e di SOUL ha mostrato le differenti proprietà di queste proteine, identificando anche il probabile sito di legame con l'eme e con gli aminoacidi coinvolti in quest'ultimo. La posizione del sito di legame con le porfirine indica un ruolo di trasportatore di eme/ferro nella cellula, piuttosto che un ruolo dell'eme come cofattore nella proteina (Gell et al., 2006). Inoltre, si è visto che, mentre p22HBP agisce come monomero legando o meno l'eme, SOUL opera come esamero legando eme e ferro insieme (Dias et al., 2006). Quindi le proteine *SOUL/HBP* consistono di fattori tetrapirrolici con alta affinità per le porfirine e l'eme.

Un recente studio sul “cleavage” della proteina umana HBP1/SOUL1, ha dimostrato il ruolo dei meccanismi post-traduzionali nella chemioattrazione di cellule dendritiche e monociti (Migeotte et al., 2006), e che HBP2/SOUL2, oltre a legare l'eme, promuove la morte cellulare inibendo il potenziale di membrana mitocondriale (Szigeti et al., 2006).

L'analisi del proteoma dell'alga unicellulare *Chlamydomonas reinhardtii*, ha evidenziato la presenza di trascritti di *Soul* nell'ocello, suggerendo un coinvolgimento nel processo di fotorecezione (Kreimer et al., 2007). In conclusione, la caratterizzazione biochimica lascia ancora inevasi diversi quesiti relativi al comportamento e alla funzione di questa famiglia durante lo sviluppo embrionale.

### **1.5. Zebrafish come sistema modello nella ricerca**

Per studiare le funzioni di queste proteine, da un punto di vista molecolare oltre

che morfologico, nell'ambito dell'ematopoiesi e più in particolare della nefrogenesi, ci siamo avvalsi di *Danio rerio*, più comunemente conosciuto come *Zebrafish*, uno dei sistemi modello più importanti nella biologia dello sviluppo, riconosciuto come tale dal National Institute of Health (NIH) americano.

*Zebrafish* si è affermato e continua a farlo sempre di più nell'ambito della ricerca scientifica, non solo in quella di base, nelle neuro-degenerazioni (Taylor et al. 2004), nella ricerca farmaceutica e in particolare nello studio delle malattie congenite ed ereditarie (Ernest et al. 2000; Neely et al. 2002; Bassett and Currie 2003; Prouty et al. 2003; Wang et al. 1998). Di piccole dimensioni (2-3 cm di lunghezza in età adulta), lo *Zebrafish* entra nella storia della Biologia grazie alla trasparenza dell'embrione, una grande capacità proliferativa, la fecondazione esterna e un breve intervallo tra una generazione e quella successiva. Inoltre la possibilità di indurre mutazioni puntiformi nei singoli geni, di isolare i mutanti, di creare linee transgeniche e di utilizzare tecnologie avanzate di biologia cellulare, trapianti di cellule e l'eliminazione selettiva di attività geniche specifiche, hanno fatto sì che lo *Zebrafish* potesse essere utilizzato in uno spettro scientifico sempre più ampio. Sulle orme del progetto genoma umano, è in via di completamento il sequenziamento dell'intero genoma di *Zebrafish* ad opera del Sanger centre ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/D\\_rerio](http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio)).

Lo *Zebrafish* si sviluppa velocemente e la maggior parte dei suoi organi è osservabile sin dai primi giorni di sviluppo. Le sue dimensioni embrionali (pochi millimetri a cinque giorni dalla nascita) e la numerosità della progenie (circa 200 uova per accoppiamento), permettono di manipolarlo in maniera quasi del tutto automatizzata, garantendo il trattamento e l'analisi di molti embrioni contemporaneamente e soprattutto una quantità di unità sperimentali vastissima.

E' stato principalmente utilizzato in passato come modello per meglio comprendere l'embriologia, grazie all'alta fecondità, alla fecondazione esterna e alla trasparenza ottica degli embrioni che permettono sia la visualizzazione diretta dei vari destini cellulari, sia la visualizzazione di proteine fluorescenti (GFP, green fluorescent protein). Allo scopo di isolare mutanti, sono stati eseguiti due grandi screening che hanno portato a una collezione di migliaia di mutanti *Zebrafish*: uno screening chimico, attraverso l'utilizzo dell'ENU (etil nitroso urea) come agente

mutageno (Brand et al., 1996), e uno screening per inserzione (Amsterdam et al., 2004). Interessanti risultati sono stati ottenuti ai fini dell'investigazione delle funzioni geniche, in particolare è stato possibile effettuare il “knock down”, ablazioni geniche funzionali, attraverso l'uso del fosforodiammidato morfolino oligonucleotide (morpholino), capace di bloccare in maniera sequenza specifica la traduzione degli RNA messaggero (Nasevicius and Ekker, 2000).

Di rilevante importanza è il recente utilizzo dello *Zebrafish* come sistema emergente per lo studio di modelli neurodegenerativi e neuromuscolari come l'Alzheimer (Tomasiewicz et al., 2002), la distrofia muscolare Duchenne e diverse miopatie (Bassette and Currie, 2003).

Inoltre, la possibilità di utilizzare mutanti chimicamente indotti e ablazioni funzionali ha fatto in modo che lo *Zebrafish* venisse usato come sistema modello per lo studio di diverse malattie umane, che coinvolgono il sistema ematopoietico, cardiovascolare ( Stainier et al., 1996; Xu et al., 2002), visivo (Goldsmith and Harris, 2003) e i disordini renali (Drummond et al., 1998). Naturalmente un tale modello presenta anche qualche svantaggio, come ad esempio il non disporre di metodi per fare il knock-out di geni tramite ricombinazione omologa, o la ridondanza genetica del genoma di *Zebrafish*, che è dovuta alla probabile duplicazione genomica o sub genomica tipica della storia evolutiva di questa specie.

### **1.5.1 *Zebrafish*: sviluppo embrionale**

In natura lo sviluppo dello *Zebrafish* avviene in un ambito di temperature che va dai 25° ai 32°centigradi. In laboratorio, per convenzione, la temperatura selezionata per lo sviluppo embrionale dello *Zebrafish* è 28,5°C (Streisinger et al., 1981). L'uovo appena fecondato si trova nel periodo zigotico fino a 40 minuti dopo la fecondazione e ha un diametro di 0,7 mm. Dopo la prima divisione di segmentazione, le successive avvengono ad intervalli di 15 minuti. Le divisioni citoplasmatiche sono parziali perché lo zigote ed i successivi mesociti inizialmente vengono completamente separati, e solo col progredire del processo di segmentazione (con piani tangenziali) si formano veri blastomeri. Questo tipo di divisione è chiamata discoidale e porta alla formazione di un mucchio di cellule

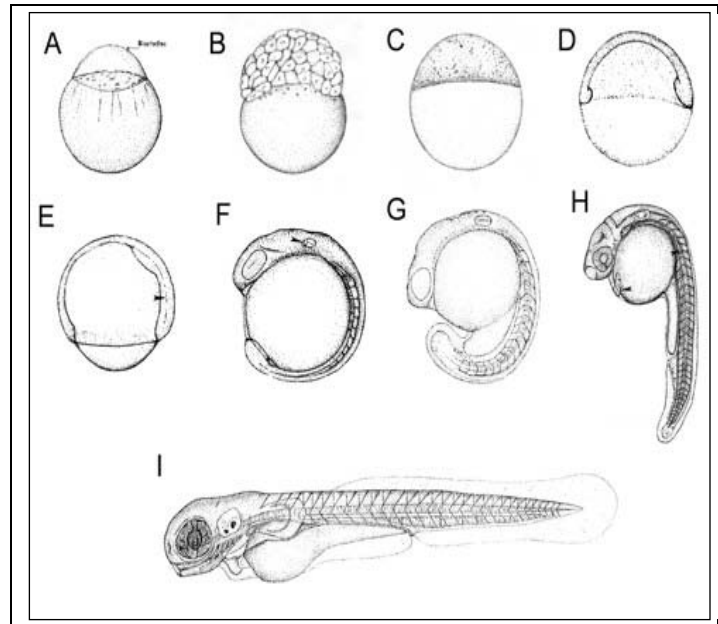
al polo animale. Queste cellule costituiscono il blastoderma. Inizialmente, tutte le cellule mantengono alcune connessioni aperte tra l'una e le altre e con le cellule sottostanti del vitello, in modo che molecole di moderata taglia (17-kDa) possano passare liberamente da un blastomero all'altro (Kimmel and Law, 1985). All'inizio della decima divisione cellulare, è possibile osservare l'inizio del passaggio allo stadio di midblastula: la trascrizione di geni zigotici inizia, le cellule si dividono più lentamente, comincia ad essere evidente il movimento cellulare (Kane and Kimmel, 1993), si forma lo strato sinciziale del vitello (YSL) e inizia l'epibolia con un assottigliamento e un'estensione sia dello YSL che del blastodisco sopra le cellule del vitello. Ha quindi inizio la gastrulazione con movimenti morfogenetici comprendenti involuzione, convergenza ed estensione, che determina la formazione dei foglietti embrionali e dell'asse embrionale. La gastrulazione inizia 5 ore dopo la fecondazione (hpf) e dura fino a 10 hpf. Ad essa segue il periodo della segmentazione del mesoderma durante il quale si sviluppano circa 30 somiti, cominciano a essere visibili i rudimenti degli organi primari, la coda inizia ad essere più prominente e l'embrione si allunga. In questo periodo sono inoltre evidenti il primordio ottico, i placodi otici alla base del mesencefalo primordiale, la vescicola di Kupffer e il primordio del pronefro, cominciano le contrazioni muscolari e il sacco vitellino si estende posteriormente. Al periodo della metamerizzazione dei somiti segue lo stadio di faringula (dalle 24 alle 48 hpf), durante il quale l'embrione di *Zebrafish* mostra le caratteristiche morfologiche tipiche dei vertebrati: è possibile riconoscere gli occhi, gli otoliti, le cellule del sangue, il sistema vascolare, i placodi olfattivi, le aree principali del sistema nervoso centrale e il pronefro.

A 48hpf, inoltre, si osserva la pompa cardiaca e la dinamica delle cellule del sangue, nonché il primordio delle pinne pettorali.

Dalle 48 alle 72 hpf l'embrione continua ad accrescersi e si formano tutti gli organi ad eccezione dell'apparato gastrointestinale e degli organi annessi. Dal terzo giorno in poi la larva avrà completato la maggior parte della sua morfogenesi e continuerà ad accrescersi rapidamente. Prominenti cambiamenti riguardano la vescica natatoria e la protrusione antero-dorsale della bocca. Il



canale digerente diviene più facilmente visibile, mentre l'estensione del vitello si assottiglia. Gradualmente la larva inizia a nuotare più attivamente e a muovere la bocca, gli opercoli, le pinne pettorali e gli occhi (**Fig. 10**).



**Fig. 10 Sviluppo embrionale di Zebrafish**

## **2. Materiali e metodi**

### **2.1. Nomenclatura**

I quattro geni omologhi di *p22HBP* e *Soul* identificati nel genoma di *Zebrafish* sono qui denominati semplicemente soul (*soul1-4*), in attesa che uno studio approfondito di filogenesi molecolare permetta di chiarire la nomenclatura in maniera definitiva.

### **2.2. Analisi delle sequenze proteiche**

Le sequenze di cDNA dei quattro geni *p22HBP* e *soul* di *Zebrafish* sono state confrontate con quelle di altri omologhi individuati nelle collezioni di sequenze depositate nelle varie banche dati disponibili in rete, GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) e TIGR ([www.tigr.com](http://www.tigr.com)) *in primis*. La caratterizzazione delle proteine per quanto concerne i profili di idrofobicità e idrofilicità, e la presenza di eventuali domini transmembrana, è stata realizzata utilizzando i programmi in rete SWISSPROT (<http://www.expasy.ch/>) e TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), rispettivamente. Per analizzare i rapporti filogenetici tra i vari membri della famiglia, e individuare eventuali cladi, o subraggruppamenti, è stato adoperato il programma Neighbour Joining nel workpackage CLUSTALW.

### **2.3. Sintesi degli oligonucleotidi**

Tutti gli oligonucleotidi sintetici impiegati sono stati preparati con un apparecchio Beckman SM-DNA Synthesizer dal Servizio di Biologia Molecolare della Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli.

### **2.4. Preparazione di RNA totali da embrioni e tessuti di *Zebrafish***

Gli embrioni e i tessuti raccolti sono stati congelati in azoto liquido e pestati fino allo stato di polvere. I tessuti selezionati e i vari stadi embrionali utilizzati sono i seguenti: milza (mi), ovario (o), cuore (c), muscolo (mu), cervello (ce), intestino (i), testicolo (t), fegato (f), 4 - 16 cellule (4 - 16), bud (b), shield (s), 70% epibolia

(70), 24 hpf (24), 5 hpf (5), 3 settimane (3), 1 mese (1), 2 mesi (2), 45 giorni (45) e 60 giorni (60). Il protocollo seguito per l'estrazione dell'RNA è quello del RNasy Mini Procedure della Qiagen.

## **2.5. Sintesi del cDNA**

La sintesi del cDNA viene effettuata a partire da RNA totali a diversi stadi di sviluppo embrionale e da alcuni tessuti. Il cDNA è stato sintetizzato con il sistema "Taq Man kit" (PE Biosystem) preparando una miscela composta da RNA proveniente da circa 100 embrioni (1µg di RNA totale), oligonucleotidi esamerici "random" (2.5µM), tampone di reazione (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.3), una miscela di dNTP (0.5mM dATP, 0.5mM dTTP, 0.5mM dCTP, 0.5mM dGTP), MgCl<sub>2</sub> (5.5mM), inibitore delle Rnasi (0.4 U/µL) e l'enzima "MultiScribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase" (1.25 U/µL).

La miscela è stata sottoposta alle seguenti condizioni termiche:

Incubazione oligonucleotidi	10 minuti a 25°C
Trascrizione inversa	60 minuti a 37°C
Disattivazione enzima RT	5 minuti a 95°C

I campioni di cDNA sono stati conservati a – 20 °C fino all'uso.

## **2.6. Amplificazione mediante PCR**

La PCR è una tecnica che permette l'amplificazione di una regione di DNA compresa tra due oligonucleotidi. Il DNA stampo è denaturato per far sì che ai singoli filamenti prodotti possano associarsi due inneschi complementari alle sequenze che delimitano la regione che si desidera amplificare.

Una DNA polimerasi termoresistente utilizza questi inneschi per polimerizzare il secondo filamento e le doppie eliche così ottenute sono nuovamente denaturate per essere riutilizzate come stampi per la reazione successiva.

La reazione si ripete per il numero di volte desiderato, producendo una grande quantità di una molecola corrispondente alla regione di DNA compresa tra i due inneschi.

I due inneschi sono, nel caso di *soul1*, un oligo al 5' corrispondente alla sequenza nucleotidica dedotta dalla regione amminoacidica V L G E I Q L S I, e un oligo al 3' corrispondente alla sequenza nucleotidica dedotta dalla regione amminoacidica L W K L T L L H H. Nel caso di *soul2*, l'oligo al 5' corrisponde alla sequenza amminoacidica V G H Q K W, mentre l'oligo al 3' corrisponde alla sequenza amminoacidica Q W W L T H Q T.

Ogni reazione è stata condotta in un volume totale di 50µL con i seguenti componenti:

• DNA	100ng
• Tampone di sintesi 10x (Tab.5)	5µL
• dNTP 10mM	5µL
• Innesco 2 (100 pmol/µL)	1µL
• Innesco 1 (100 pmol/µL)	1µL
• Taq DNA polimerasi (0.5U/µL)	1µL

La miscela è stata conservata alla temperatura di denaturazione di 94°C per 5 minuti. I successivi cicli di amplificazione, di seguito descritti, sono stati condotti mediante un Thermal Cycler Perkin-Elmer-Cetus. Dopo la denaturazione, la miscela è stata portata per due minuti alla temperatura di “annealing” (54°C) compatibile con gli oligonucleotidi usati, l’allungamento è avvenuto a 72°C per due minuti. Tale ciclo di amplificazione è stato ripetuto 35 volte. Inoltre per migliorare l’efficienza di amplificazione (quantità elevata del prodotto) e la specificità (nessun prodotto non specifico) del prodotto di PCR, si è aggiunto DMSO (dimetilsolfossido) pari al 5% del volume finale. Ovviamente, come

controllo del programma PCR, su ciascuno dei campioni è stata fatta una PCR per amplificare il gene *EF1 $\alpha$*  (*elongation factor 1 alpha*), un fattore codificante per una proteina implicata nell'allungamento della catena peptidica durante la biosintesi delle proteine, e quindi ubiquitariamente espresso in tutte le cellule.

Al termine dei 35 cicli, 20 $\mu$ L della reazione sono stati analizzati su un gel di agarosio 1% in TAE 1X. Il rimanente della miscela è stato conservato a 4°C.

## 2.7. Clonaggio di *soul1* in pBluescript SK- vector

Un clone IMAGE contenente una sequenza di cDNA annotata come gene *hbp2* è stato acquistato dalla ImaGenes in Berlino come frammento di cDNA clonato nel vettore **pME18S-FL3** (*Fig.11*). Per verificare l'identità del clone abbiamo proceduto al sequenziamento e dal BLAST della sequenza abbiamo confermato la presenza, all'interno del clone, dell'intera regione codificante un gene omologo di *hbp2*, che è stato quindi successivamente subclonato nel vettore **pBluescript SK-** con l'enzima di restrizione EcoRV (*Fig.12*) attraverso una reazione di ligasi:

•	Tampone Ligasi 10X	1 $\mu$ L
•	DTT 100mM	0.5 $\mu$ L
•	ATP 10mM	0.5 $\mu$ L
•	vettore <b>pBluescript SK-</b> (50ng/mL)	1 $\mu$ L
•	DNA	2 $\mu$ L
•	T4 DNA ligasi	0.5 $\mu$ L
•	H <sub>2</sub> O sterile	4.5 $\mu$ L

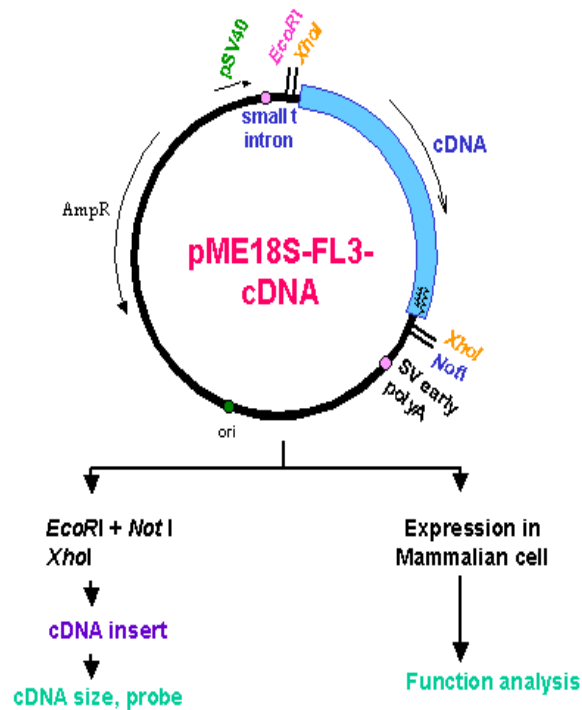
La reazione di ligasi T4 è stata incubata a 16°C tutta la notte e in seguito inattivata a 65°C per 10 minuti.

5' region :

.....TGAATTCCTCGAGCACTGTTGGCCTACTGG.....  
 Vector ← | → Linker ← | → cDNA

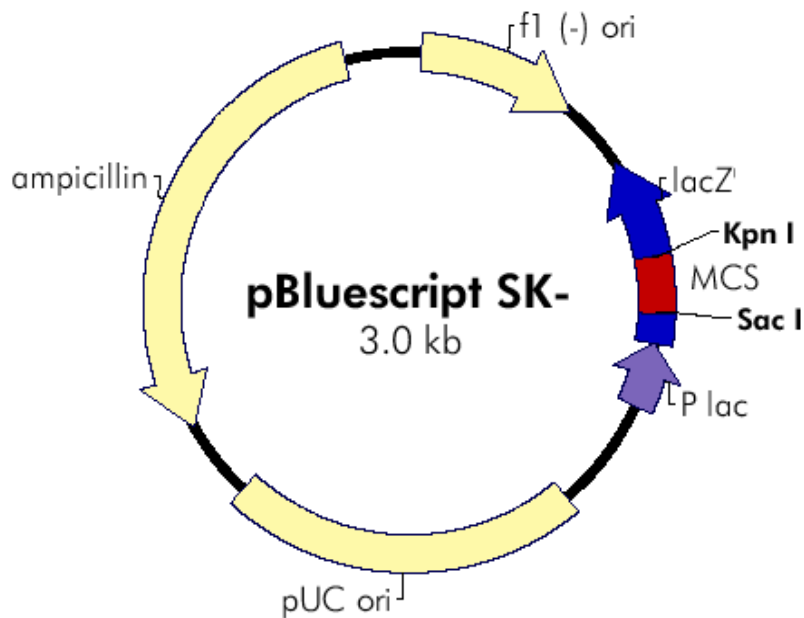
3' region :

.....AAAAGGCCACATGTGCTCGAGCTGC.....  
 cDNA ← | → Linker ← | → Vector



### Multi-functional pME18S-FL3 vector

*Fig.11: Vettore pME18s-FL3-cDNA*

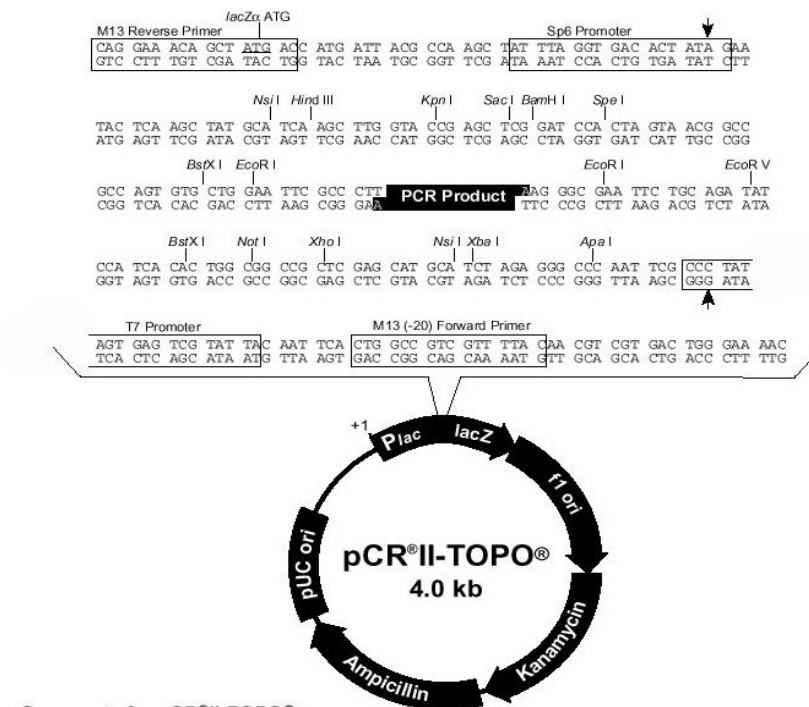


**Fig.12: Vettore pBluescript SK-**

## 2.8. Clonaggio di *soul2* pCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup>

Il gene *soul2* è stato amplificato e clonato nel vettore pCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup> (Fig.13) direttamente da prodotto PCR utilizzando la temperatura di 37°C per 30':

- |                            |     |
|----------------------------|-----|
| • TOPO Cloning             | 1μL |
| • Prodotto PCR             | 2μL |
| • Soluzione salina         | 1μL |
| • H <sub>2</sub> O sterile | 5μL |



**Comments for pCR®II-TOPO®  
3973 nucleotides**

LacZα gene: bases 1-589  
M13 Reverse priming site: bases 205-221  
Sp6 promoter: bases 239-256  
Multiple Cloning Site: bases 269-383  
T7 promoter: bases 406-425  
M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448  
f1 origin: bases 590-1027  
Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155  
Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033  
pUC origin: bases 3178-3851

**Fig.13: Vettore pCRII-TOPO**



## 2.9 Clonaggio di *soul3* e *soul4*

Due cloni IMAGE contenenti sequenze di cDNA annotate come geni *Soul/heme-binding protein 1* sono stati acquistati dalla ImaGenes in Berlino. All'origine, entrambi i frammenti di cDNA di *soul3* e *soul4* sono inseriti nel vettore **pME18S-FL3 (Fig.11)**. Per verificare l'identità dei cloni si è proceduto al sequenziamento e dal BLAST della sequenza si è potuto confermare la presenza, all'interno dei due vettori, dell'intera regione codificante di geni appartenenti alla famiglia *hbp1*. Successivamente, il cDNA di *soul3* è stato trasferito nel vettore **TopoTA (Fig.13)** con l'enzima BamHI, e quello di *soul4* nel vettore **pBluescript SK-** con l'enzima di restrizione EcoRI (**Fig.12**), attraverso una reazione di ligasi:

• Tampone Ligasi 10X	1μL
• DTT 100mM	0.5μL
• ATP 10mM	0.5μL
• Vettore <b>pBluescript SK-</b> (50ng/mL)	1μL
• DNA	2μL
• T4 DNA ligasi	0.5μL
• H <sub>2</sub> O sterile	4.5μL

La reazione di ligasi T4 è stata incubata a 16°C tutta la notte e in seguito inattivata a 65°C per 10 minuti come da protocollo.

## 2.10. Trasformazione di DNA plasmidico in cellule batteriche mediante elettroporazione

Questa tecnica permette di inserire costrutti di DNA in cellule batteriche competenti, le quali sono sottoposte a shock elettrico per provocare l'apertura dei pori della membrana plasmatica. Per le trasformazioni sono stati usati circa 10μL delle reazioni di ligasi, precedentemente inattivate a 65°C per 10 minuti, raffreddate in ghiaccio e microdializzate con dH<sub>2</sub>O sterile per un'ora. Si è

utilizzata un'elettrocuvetta Bio-Rad Gene Pulser contenente il DNA plasmidico e le cellule batteriche del ceppo *Escherichia coli* "TOP 10" competenti per l'elettroporazione, posizionata nell'apposito alloggiamento dell'elettroporatore Bio-Rad Gene Pulser. Dopo l'impulso elettrico a voltaggio costante di 1.7 V, le cellule sono state risospese in 800µL di terreno di coltura Luria-Bertani (LB) e poste a 37°C per 1 ora; in seguito, aliquote di 10-200µL sono state piastrate su substrato solido (agar e LB) con l'antibiotico per il quale il plasmide mostra resistenza, e messe a crescere tutta la notte a 37°C. Successivamente sono stati preparati gli inoculi nei tubicini da batteri aggiungendo LB con l'antibiotico, utilizzando punte sterili per prelevare le colonie dalla piastra e metterle nel tubicino nell'agitatore a 37°C per 16 h.

## 2.11. PCR colony

Al fine di selezionare i cloni contenenti il plasmide, le colonie presenti sulle piastre sono state sottoposte a PCR colony.

Per effettuare la PCR colony sono stati adoperati due oligonucleotidi, M13 Reverse ed M13 Forward, le cui sequenze complementari sono presenti su entrambi i plasmidi **pCRII-TOPO** e **pBluescript SK<sup>-</sup>** dove fiancheggiano l'inserto.

Per ogni colonia la reazione di amplificazione è stata eseguita in un volume totale di 20µL, contenente gli oligonucleotidi (1pmol/µL), una miscela di dNTP (0.2µM), tampone di reazione 1X (Roche 10X PCR buffer) e Taq Polimerasi (0.01U/µL). In ogni miscela è stata immersa un'ansa in precedenza passata sulla colonia da controllare. Inoltre le stesse anse sono state adoperate per fare una replica su di una nuova piastra (terreno LB minimo contenente ampicillina 0.1µg/mL) e poste infine in tubi da inoculo contenenti ciascuno 3 ml di brodo di coltura LB con ampicillina (0.1µg/mL). Le piastre così ottenute sono state poste in un incubatore a 37 °C per 12 ore. I tubi da inoculo sono stati posti in un incubatore a 37°C per 12 ore, sotto agitazione (240 rotazioni per minuto, rpm).

La PCR colony è stata condotta sottoponendo le reazioni di amplificazione ai seguenti cicli:

- Denaturazione (1 ciclo): 5 minuti a 95°C
- Denaturazione (30 cicli): 1 minuto a 94°C
- Annealing: 1 minuto a 52°C
- Polimerizzazione: 2 minuti a 72°C
- Elongazione (1 ciclo): 5 minuti a 72°C

La presenza di bande di amplificazione della lunghezza attesa è stata osservata analizzando i campioni su gel di agarosio (1,2% in tampone TAE) per mezzo di uno standard di riferimento.

Da alcuni inoculi corrispondenti alle colonie positive è stata fatta una mini preparazione di DNA plasmidico facendo uso del sistema “Qiagen Plasmid Mini Kit”, seguendo la procedura consigliata.

## **2.12. Maxipreparazione di DNA plasmidico**

La maxipreparazione di DNA plasmidico è stata eseguita ponendo a crescere a 37°C, per circa 2 ore, in agitazione (240 rpm), un pre-inoculo costituito da 10mL di brodo sterile LB (1% triptone, 1% NaCl, 0.5% estratto di lievito), ampicillina (0.1µg/mL) e un'ansa previamente strisciata sulla rispettiva colonia. Al termine delle 2 ore, il pre-inoculo è stato trasferito in una beuta contenente 250mL di brodo sterile LB ed ampicillina (0.1µg/mL). L'inoculo così composto è stato incubato a 37 °C, sotto agitazione (240 rpm), per 12 ore.

La purificazione del DNA plasmidico è stata eseguita avvalendosi del sistema “Qiagen Plasmid Maxi Kit”, seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

Dello stesso campione è stato inoltre preparato uno stab prelevando 800µl di coltura batterica dall'inoculo ed aggiungendovi 200µL di glicerolo sterile. Tale miscela è stata agitata generosamente e conservata a -80 °C.

A purificazione avvenuta, il campione è stato quantificato allo spettrofotometro.

### 2.13. Sequenziamento del DNA plasmidico

I campioni sono stati esaminati allo spettrofotometro leggendone l'assorbanza ai valori di 260nm, per la quantificazione del DNA, e a 280nm, per verificarne la purezza (il valore del rapporto 260nm/280nm deve essere compreso tra 1.6 e 2.0).

Il sequenziamento del DNA plasmidico è stato fatto preparando la seguente miscela per ciascun campione:

- DNA plasmidico 12.5pM in H<sub>2</sub>O
- Primer 1.25μM in H<sub>2</sub>O

in un volume finale di 10μL.

Le sequenze sono state realizzate dal Servizio SBM di Biologia Molecolare della Stazione Zoologica utilizzando il metodo di marcatura "Dye Terminator" ed il sequenziatore automatico ad elettroforesi capillare ad alta capacità "Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer".

Le sequenze sono state analizzate utilizzando il programma SeqMan-DNAStar.

### 2.14. Trascrizione in vitro di ribosonde

I plasmidi sono stati linearizzati per digestione con appropriati enzimi, per ottenere rispettivamente i templati per la sintesi delle ribosonde senso ed antisenso. Le digestioni sono state effettuate preparando una miscela contenente 10μg di plasmide, 5U di enzima di restrizione, buffer di reazione; gli enzimi di restrizione utilizzati per i quattro geni sono stati XhoI e BamHI per *soul1* in **pBluescript SK-**, EcoRV e BamHI per *soul2* in **pCR® II-TOPO®**, EcoRV e BamHI per *soul3* in **pCR® II-TOPO®**, e EcoRI e SpeI per *soul4* in **pBluescript SK-**. Tali plasmidi possiedono a monte e a valle del sito di clonaggio due promotori, T3 e T7 in **pBluescript SK-**, e SP6 e T7 in **pCR® II-TOPO®**, siti che vengono riconosciuti da specifiche RNA polimerasi che possono produrre, perciò, trascritti del frammento contenuto nel vettore ricombinante. Le digestioni sono state eseguite in un volume finale di 50μL e sono state poste in incubazione a 37°C per tutta la notte. La completa linearizzazione dei plasmidi è stata controllata

mediante analisi elettroforetica su gel d'agarosio (1% in tampone TAE). I campioni linearizzati sono stati sottoposti a una reazione con Proteinase K (PK) così condotta: plasmide linearizzato, Tris 0.1M pH 7.4, SDS 0.5%, PK (40g), in H<sub>2</sub>O DEPC, in un volume complessivo di 200μL. La reazione è stata posta per 30 minuti alla temperatura di 42°C. I plasmidi linearizzati e trattati con PK sono stati purificati mediante estrazione con un volume di fenolo-cloroformio-alcool isoamilico (25:24:1) e centrifugazione a 14000 rpm per 1 minuto. La fase acquosa è stata estratta con un volume di cloroformio ed il sovrantante precipitato con due volumi di etanolo 100%, Na acetato 0.3 M pH 5.2 e glicogeno (0.05μg/μL) (Ambion). I campioni sono stati posti a – 80 °C per 1 ora. Sono quindi stati centrifugati a 14000 rpm per 30 minuti. Si è provveduto a lavare i pellets in etanolo 70% ed in seguito a centrifugare a 14000 rpm per 15 minuti. Infine i pellets sono stati liberati dall'etanolo, fatti asciugare all'aria e risospesi in H<sub>2</sub>O DEPC.

La trascrizione *in vitro* è stata effettuata utilizzando il “DIG RNA labeling kit” (Roche). Con questo sistema è stato possibile marcare l'RNA messaggero prodotto *in vitro* usando la digossigenina, un composto steroide isolato dalla pianta *Digitalis planaria*, il quale funziona come aptene legato covalentemente, attraverso un braccio spaziatore contenente undici atomi di carbonio, alla posizione C-5 dell'UTP. Il precursore DIG-UTP sarà incorporato nel frammento di RNA sintetizzato poiché riconosciuto come un "comune" nucleotide dalle RNA polimerasi utilizzate, producendo così sonde di RNA marcate. Per produrre gli RNA senso ed antisense, è stata dunque preparata la seguente miscela di reazione:

- DNA plasmidico linearizzato            1μg
- Miscela di NTP 10X                        2μL
- Tampone di trascrizione 10X            2μL
- Inibitore delle RNAsi (20U/μL)        1μL
- T7 RNA polimerasi (20U/μL)            2μL

Oppure

- T3 RNA polimerasi (20 U/μL)            2μL

Oppure

- SP6 polimerasi 2μL
- H<sub>2</sub>O trattata con DEPC fino ad un volume finale di 20μL.

La reazione di sintesi è stata effettuata alla temperatura di 37°C per 2 ore, successivamente sono stati aggiunti 2μL di DNasi I (10U/μL) priva di attività RNAsica, ed il tutto incubato ancora a 37°C per 20 minuti, per eliminare il DNA stampo. La reazione è stata, infine, bloccata mediante aggiunta di 2μL di EDTA 0,2 M pH 8. Le ribosonde sono state purificate tramite cromatografia per esclusione molecolare su Sephadex G50 con l'ausilio delle colonnine "mini Quick Spin RNA Columns" (Roche) e conservate alla temperatura di -80 °C fino all'uso.

Le sonde sintetizzate sono:

- per *Soul1* un frammento di 800 bp;
- per *Soul2* un frammento di 600 bp;
- per *Soul 3* un frammento di 1471 bp;
- per *Soul4* un frammento di 1172 bp.

Plasmidi	Enzimi di restrizione	Polymerase
<i>Soul1</i>	XhoI	T3
<i>Soul2</i>	EcoRV	Sp6
<i>Soul3</i>	BamHI	T7
<i>Soul4</i>	EcoRI	T7

***Plasmidi ed enzimi usati per preparare sonde antisenso a RNA per ISH***

## **2.15. Quantizzazione delle sonde a RNA**

Per valutare la concentrazione degli RNA prodotti per trascrizione *in vitro*, è stato utilizzato un saggio immunoenzimatico (Dot Blot) ricorrendo all'utilizzo di anticorpi anti-digossigenina coniugati con l'enzima fosfatasi alcalina.

La quantificazione delle ribosonde digossigenina-coniugate è avvenuta facendo delle diluizioni seriali 1:4 dei campioni da analizzare e di un campione di RNA di riferimento (100ng/μL), in un tampone di diluizione composto da SSC 6X, Formaldeide, H<sub>2</sub>O DEPC (3:2:5). Un microlitro di ogni diluizione è stato posto su di una membrana di nylon (Hybond<sup>TM</sup>-N+, Amersham Life Science); la membrana è stata fatta asciugare all'aria. In seguito le ribosonde e l'RNA di riferimento sono stati fissati alla membrana esponendola a raggi UV per 1 minuto. La membrana è stata quindi lavata per 30 minuti a temperatura ambiente in agitazione, con una soluzione costituita da tampone MBT e soluzione di bloccaggio, nelle proporzioni di 9:1. In seguito la membrana è stata incubata con anticorpo anti-digossigenina coniugato a fosfatasi alcalina (1:5000), nella medesima soluzione, lasciando in agitazione per 1 ora a temperatura ambiente.

Trascorso tale periodo, il filtro è stato sottoposto a due lavaggi consecutivi della durata di 15 minuti ciascuno, con tampone MBT. Quindi è stato effettuato un lavaggio in tampone AP pH 9.5. La soluzione di rivelazione è stata preparata in ghiaccio e al riparo da fonti luminose aggiungendo al tampone AP pH 9.5 i composti NBT (100mg/mL) e BCIP (50mg/mL) (Sigma). La membrana è stata incubata in tale soluzione al riparo dalla luce, per circa 10 minuti. A rivelazione avvenuta, il filtro è stato lavato sotto acqua corrente per bloccare la reazione ed è stato asciugato all'aria ponendolo su carta 3MM. Quindi si è provveduto alla stima delle concentrazioni delle ribosonde rispetto al campione di RNA di riferimento.

## **2.16. Preparazione degli animali**

Il lavoro è stato svolto su adulti ed embrioni di *Zebrafish* allevati seguendo le procedure standard (Westerfield, 2000). Gli embrioni fatti crescere alla temperatura ottimale di 28.5°C, sono stati fissati a diversi stadi di sviluppo (hpf e dpf). Sia gli embrioni usati come controllo che quelli per fini sperimentali sono

stati posti a crescere in “embryo medium” contenente phenylthiourea (PTU), una sostanza in grado di inibire lo sviluppo della pigmentazione. Gli embrioni e le larve sono stati decorionati manualmente e anestetizzati in tricaina. Successivamente sono stati fissati per tutta la notte (ON) a 4°C, in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 per gli esperimenti di ibridazione *in situ* e immunoistochimica. Dopo il fissaggio sono stati lavati in PBS 1X contenente 0.1% Tween20 (PBT) e sono stati conservati in metanolo assoluto a -20°C.

## **2.17. Ibridazione *in situ***

L'ibridazione *in situ* con gli RNA sintetici marcati con digossigenina è stata effettuata utilizzando il protocollo *Maleico*.

Dopo reidratazione mediante lavaggi in scala di metanoli al 75%, 50%, e 25% in PBS 1X + Tween20 (PBT), gli embrioni sono stati lavati in PBT e poi sottoposti a trattamento con PK che ha il compito di denaturare tutte le proteine dell'embrione e permeabilizzare i tessuti. Al termine dell'esposizione alla PK, gli embrioni sono stati dapprima post-fissati in PFA al 4% in PBS 1X per 20 minuti e poi lavati ripetutamente in PBT.

Gli embrioni sono stati messi in una soluzione d'ibridazione opportunamente preparata per 2 ore in un bagnetto termostato alla temperatura di annealing della sonda ad RNA (calcolata in base al numero di basi Guanina e Citosina presenti nella sequenza della sonda che si sta utilizzando), che è stata aggiunta al termine delle 2 ore di pre-ibridazione in quantità tra i 50ng per *soul4* e i 300ng totali per gli altri tre geni per mL di soluzione di ibridazione (HM), e lasciata a ibridare tutta la notte.

Il giorno seguente la sonda è stata recuperata e conservata a una temperatura di -80°C per essere riutilizzata (fino a 8 volte), e gli embrioni sono stati lavati con la soluzione di ibridazione, nuovamente preparata, e successivamente con il 75%, 50%, 25% di HM in 2X SSC alla temperatura di ibridazione. In seguito i lavaggi sono stati eseguiti con 2X SSC e 0,2X SSC a temperatura ambiente per aumentare la stringenza e rimuovere i legami aspecifici della sonda. I campioni sono stati



incubati in una soluzione per bloccare legami specifici per almeno un'ora e poi lasciati tutta la notte in presenza di un anticorpo legato alla fosfatasi alcalina (AP anti-DIG) diluito 1:5000 nella soluzione di blocking alla temperatura di 4°C.

Il terzo giorno l'anticorpo è stato rimosso dai tubini ed è stata effettuata una serie di lavaggi per allontanare i residui prima di passare alla "detection" del segnale con BM Purple (Roche), passaggio da compiere al buio per evitare che il substrato sottoposto alla luce precipiti. Una volta rivelato il segnale nel tessuto atteso, la colorazione è stata stoppata con diversi lavaggi in PBT e PBS 1X + EDTA 10Mm e i campioni sono infine stati conservati in PFA 4% in PBS 1X a 4°C per tutta la notte. Dopo la post-fissazione sono stati effettuati ulteriori lavaggi in PBT per allontanare la paraformaldeide e si è proceduto con lavaggi in scala di glicerolo fino al 90% in PBS 1X per fotografare gli embrioni, utilizzando un microscopio composto AxioImager M1 (Zeiss).

## **2.18. RT-PCR**

Per confermare l'espressione spazio-temporale dei geni *Soul*, opportuni oligonucleotidi sono stati disegnati e si è proceduto con l'estrazione di RNA e sintesi di cDNA da tessuti e dagli stadi di sviluppo utilizzati per gli esperimenti di ibridazione *in situ*.

## **2.19. Microiniezioni di oligonucleotidi antisenso (morfolino) in uova fecondate**

I morfolino sono oligonucleotidi antisenso di lunghezza variabile tra le 18 e 25 basi nucleotidiche complementari alla sequenza del gene di interesse. La funzione principale è quella di bloccare la traduzione dell'mRNA e quindi la sintesi della proteina.

In questi oligonucleotidi, il deossiribosio è sostituito con un anello N-morfolino, che conferisce grande stabilità e consente di ottenere effetti più specifici rispetto ad altri analoghi antisenso. I morfolino si legano all'mRNA e ne prevengono la traduzione, soprattutto se disegnati in corrispondenza del codone di inizio, o interferiscono con la maturazione dell'mRNA se sono diretti contro un sito di

splicing. Per la scelta del tipo di morfolino da adottare e della sua sequenza, è necessario conoscere la sequenza completa del cDNA di interesse, in particolare la regione al 5'.

Nel caso specifico del gene *soul2*, gli oligonucleotidi sono stati disegnati e forniti come prodotto liofilizzato dalla Gene Tools, LLC, a partire dalla sequenza proteica del gene:

- Morfolino di *soul2 spl site*: 5' AGTATTTTTGTGTACTTACTCTCCT 3'
- Morfolino di *soul2 ATG*: 5' GCAGAAGCCACAATACATCGCCATTT 3'

Il *knock-down* dei geni è avvenuto attraverso le microiniezioni di morfolino, seguendo il protocollo di Gilmour et al., 2000. L'intero settaggio strumentale è formato da uno stereomicroscopio Zeiss, un micromanipolatore modello serie MN della Narishige e da un Picospritzer® III della Parker Instrumentation.

Le uova appena fecondate sono state raccolte, pulite e orientate col polo animale verso il capillare. Gli aghi utilizzati per la microiniezione, sono ricavati da tubi capillari (Microcaps da Drummond Sci. Co., Broomall, PA, USA), opportunamente tirati con uno strumento specifico "microelectrode puller" (Model PN-3, Narishige, Tokyo) scegliendo condizioni di pressione e temperatura idonee alle esigenze di microiniezione.

Una volta preparati gli aghi, questi sono stati riempiti con una soluzione contenente un range di concentrazione di morfolino tra 100µM e 300µM in acqua sterile contenente come marcatore colorante 0,5% di rosso fenolo (Sigma) e microiniettati nelle uova fecondate. Il volume iniettato è stato stimato essere circa il 5% del volume delle uova controllando la quantità di rosso fenolo co-iniettato.

I due morfolino RNAs sono stati iniettati prima separatamente a diverse concentrazioni (0.1 mM, 0.3 mM e 0.5 mM), e poi insieme. Le soluzioni sono state microiniettate nel citoplasma del singolo blastomero o nel vitello, calibrando il volume della soluzione pari a circa 1/20 del volume dell'uovo fecondato, per non danneggiare la cellula. Come controllo negativo è stato iniettato anche un morfolino di controllo (standard control); in questo modo è stato possibile osservare gli effetti endogeni e aspecifici del morfolino. Un altro gruppo di

embrioni è stato iniettato con la sola soluzione di Danieu e rosso fenolo priva del morfolino, come ulteriore controllo negativo per escludere effetti dovuti all'iniezione nell'osservazione del fenotipo. Gli esperimenti sono stati ripetuti diverse volte e si è proceduto ogni volta a contare il numero di animali morti per ogni gruppo di iniezione. Dal confronto della mortalità degli embrioni di controllo con quella degli embrioni iniettati con il morfolino di *soul2* è stato possibile arrivare alla giusta concentrazione di morfolino che produce effetti abbastanza rilevanti con una ridotta mortalità.

La quantità di morfolino non tossica per gli embrioni che ha prodotto la più bassa mortalità e un fenotipo più evidente è stata di 0.3 mM.

Il fenotipo è stato studiato prima molecularmente, attraverso l'analisi dell'espressione di marcatori rene e sangue specifici, e successivamente biochimicamente attraverso saggi enzimatici e colture cellulari.

Gli embrioni non iniettati sono stati raccolti e usati come controllo positivo. Un primo gruppo di embrioni selvatici e iniettati è stata decorionato e fissato in paraformaldeide 4% in PBS 1X a 24 hpf per essere sottoposti a esperimenti di ibridazione *in situ*.

## **2.20. Clonaggio e sintesi di sonde di marcatori ematopoietici e renali**

Marcatori ematopoietici e renali sono stati clonati a partire sia da cloni IMAGE acquistati dalla ImaGenes in Berlino, sia attraverso PCR utilizzando gli oligo specifici disegnati sulla base delle sequenze disponibili in rete, sia da plasmidi già disponibili. Tutti i geni sono stati clonati nei vettori **pBluescript SK-** e **TopoTA** (**Fig 12** e **Fig.13**) su descritti. I marcatori renali utilizzati sono: *ret1*, *gata3*, *slc12a1*, *trpm 7*, mentre quelli ematopoietici sono: *hbbe1.1* e *tfr1a*.

Per i seguenti marcatori sono state utilizzate le stesse procedure di clonaggio, trasformazione, preparazione di DNA plasmidico, digestioni e sintesi di ribosonde precedentemente descritte.

Plasmidi	Enzimi di restrizione	Polymerase
<i>gata3</i>	EcoRI	T7
<i>ret1</i>	BamHI	Sp6
<i>slc12a1</i>	EcoRI	T7
<i>trpm 7</i>	NotI	Sp6
<i>hbbe1.1</i>	KpnI+XmaI	T7
<i>tfr1a</i>	ClaI	T7

#### ***Plasmidi ed enzimi usati per preparare sonde antisenso a RNA per ISH***

La caratterizzazione dei morfanti di *soul2* con le ribosonde ottenute, è stata effettuata mediante ibridazione *in situ*, la cui procedura è già stata descritta, su embrioni interi a 24 hpf. La temperatura di ibridazione utilizzata per tutte le sonde è stata di 65°C e la concentrazione di 300ng totali in un mL di soluzione di ibridazione.

#### **2.21. Iniezione del morfolino *gata1* in uova fecondate**

La microiniezione del morfolino *gata1* è stata realizzata utilizzando l'oligonucleotide modificato gentilmente donato dal Dott. Alan J. Davidson (Simches Research Building, MGH, Boston). Tale morfolino è stato disegnato contro il sito di attivazione trascrizionale contenente il codone ATG. Le concentrazioni utilizzate sono state 1mM e 0.4mM (Jenna L. et al., 2006), e sono state iniettate in embrioni agli stadi da una a quattro cellule. I morfanti sono stati caratterizzati mediante ibridazione *in situ* con la sonda di *soul2* e *hhbe1* seguendo il protocollo standard già descritto a una temperatura di ibridazione di 62°C.

## 2.22. Clonaggio di *soull* in pEGFP/N1 per mRNA

Al fine di creare un costrutto che contenga l'intera sequenza codificante del nostro gene al fine di produrre un eccesso di proteina nelle cellule embrionali, l'inserto presente nel vettore **pME18S/FL13** è stato subclonato nel vettore **pEGFP-N1** (*Fig.14*). L'amplificazione dell'inserto in **pME18S/FL13** è stata realizzata utilizzando due oligo specifici per *soull*, uno posizionato sull'ATG, e l'altro al 3', disegnato in modo da eliminare il codone stop. Per facilitare la ligazione nel vettore **pEGFP-N1**, entrambi gli oligo contengono la cassetta di restrizione per l'enzima XhoI:

Oligo forward:

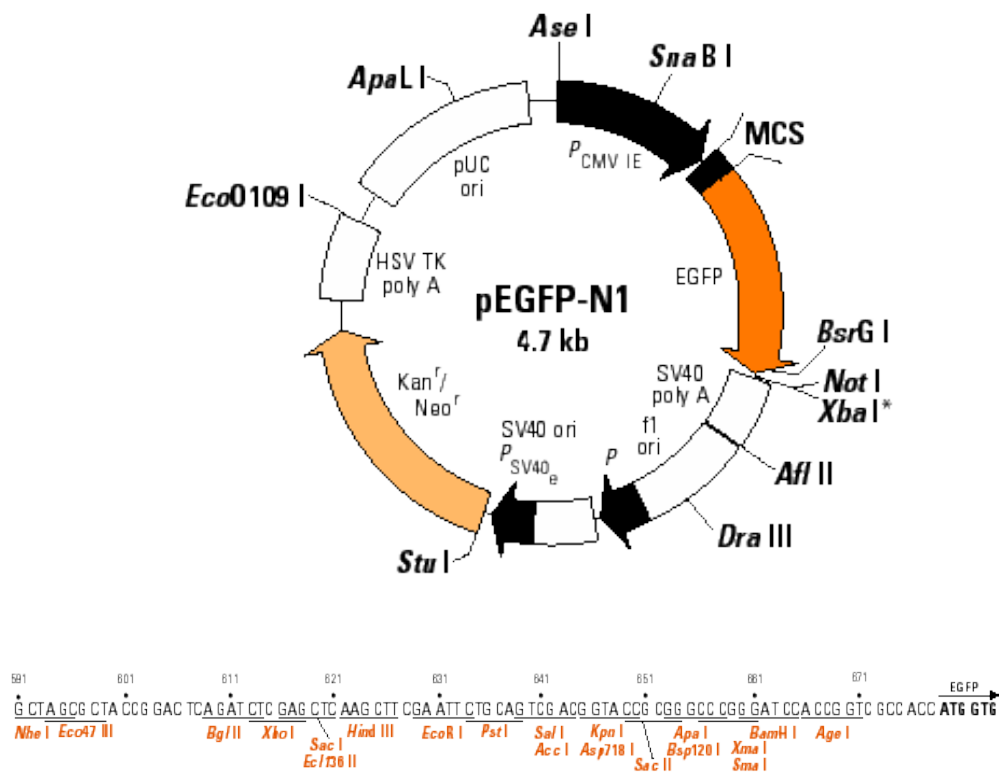
5'CGAGCCTCGAGCCACCATGCTTAAAGCCATCGGTC3'

Oligo reverse:

5'CGAGCCTCGAGCTCCTCATCTTTGATGAGC3'

Dopo l'amplificazione la soluzione è stata fatta correre su gel per determinare l'avvenuta amplificazione e la lunghezza dell'inserto, a cui è seguita una estrazione da gel.

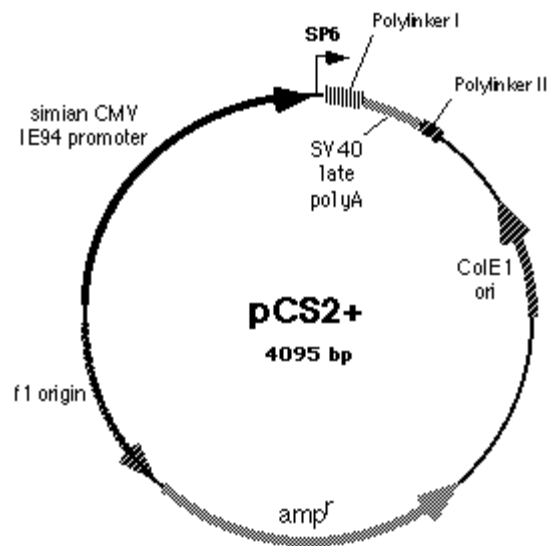
In seguito sia l'inserto sia il vettore sono stati digeriti con XhoI e si è eseguita la reazione di ligasi.



**Fig.14: Vettore pEGFP-N1**

### 2.23. Clonaggio di *soull* nel vettore pCS2+ per mRNA

Il vettore **pEGF-N1** non è adatto alla trascrizione di RNA poiché è privo di promotori per le RNA polimerasi. E' stato pertanto necessario rimuovere l'inserto *soull*/GFP da tale vettore per un ulteriore subclonazione in un plasmide idoneo, **pCS2+** (**Fig.15**) appunto (gentilmente distribuito da D. Turner, Univ. Washington). Si è dunque estratto l'inserto tagliando il plasmide con due enzimi di restrizione, BglIII che taglia a monte di *soull*, e NotI che taglia a valle della GFP. Si è in seguito effettuato il "fill-in" dell'inserto e del pCS2+GFP, digerito con XhoI, per poi effettuare la reazione di ligasi.



**Fig.15: Vettore pCS2+**

## 2.24. Clonaggio di *soul2* nel vettore pCS2+GFP per mRNA

Per la preparazione di un costrutto *soul2*-GFP è stato possibile utilizzare il vettore **pCS2+GFP**, incompatibile con *soul1* in quanto recante siti di restrizione per il subclonaggio presenti anche nella sequenza di *soul1*. Viceversa, la sequenza nucleotidica di *soul2* è risultata idonea a un subclonaggio effettuato mediante NcoI, enzima di restrizione che taglia a monte e a valle della ORF (open reading frame) della GFP. Si è dunque ipotizzata una strategia di clonaggio, con la GFP a valle di *soul2*, disegnando una coppia di oligo:

Oligo forward contenente il sito per NcoI:

5' GGATCCATGGCGATGTATGTGGCTTC 3'

Oligo reverse senza codone stop e contenente il sito per NcoI:

5' CCATGGCGGGTGCATGGACCCAAACTT 3'

Sono state pertanto compiute un'amplificazione e una reazione di ligasi, digerendo inserto e plasmide con BamHI e XhoI. Si è verificato la direzione dell'inserto e la correttezza della sequenza mediante sequenziamento.

Per ottenere l'mRNA di *soul2-GFP*, il plasmide è stato digerito con NotI e l'mRNA è stato sintetizzato usando il kit “mMessage mMachine Sp6” (Ambion), seguendo il protocollo standard.

## **2.25. Clonaggio di *soul2*-FlagTag nel vettore pCS2+ per transfezione e mRNA**

Per individuare la localizzazione citoplasmatica di *soul2* si è proceduto con la preparazione di un costrutto *soul2*-FlagTag, utilizzando il vettore **pCS2+**. La sequenza nucleotidica di *soul2* è stata idonea a un subclonaggio effettuato mediante oligo contenenti la sequenza Kozak, ovvero una sequenza consenso per l'inizio della traduzione (ACCAUGG) con un sito di legame per la subunità piccola del ribosoma (Kozak, 1986), e i siti BamHI e EcoRI. Si è dunque ipotizzata una strategia di clonaggio, con FlagTag a valle di *soul2*, disegnando la seguente coppia di oligo:

Oligo forward, contenente la sequenza Kozak e il sito per BamHI:

5'GGATCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGATGGCGATGTAT  
GTGGCTT3'

Oligo reverse senza codone stop e contenente il sito per EcoRI:

5' GAATTCTCAGGGTGCATGGACCCA 3'

Si è pertanto proceduto con l'amplificazione mediante PCR a una temperatura di dissociazione (melting) pari a 62° ottenendo un frammento di 600bp. Il prodotto PCR ottenuto è stato purificato con il kit “QIAquick PCR Purification” (Qiagen). Cinque volumi di Buffer PB sono stati aggiunti al volume di prodotto PCR. La mix ottenuta è stata caricata su apposita colonnina QIAquick spin column e il tutto è stato centrifugato a una velocità di 13000 rpm per un minuto. La colonnina è



stata lavata con il Buffer PE in centrifuga a 13000 rpm per un minuto e infine il DNA è stato eluito in un volume finale di 50µL e conservato a -20°C. Successivamente si è proceduto con la digestione dell'inserto e del vettore **pCS2+** (**Fig.15**) con gli enzimi BamHI ed EcoRI. La reazione di ligasi è stata effettuata utilizzando il protocollo già descritto in precedenza (*vedi paragrafo 2.7.*). Il prodotto di ligasi è stato amplificato mediante trasformazione chimica, utilizzando piastre con terreno di coltura LB, come previamente descritto, con resistenza all'ampicillina. Si è verificato la direzione dell'inserto e la correttezza della sequenza mediante sequenziamento.

L'mRNA è stato ottenuto utilizzando il kit “mMessage mMachine” (Ambion) utilizzando l'Sp6 polimerasi.

## **2.26. Transfezione di *soul2*-Flag-pCS2+ in cellule epiteliali umane 293T**

Le cellule 293T sono state incubate in un mezzo, “Dulbecco's modified Eagle's medium”, contenente 10% siero fetale di bovino e 0.1% gentamicina a 37°C. Si è proceduto con la preparazione di una miscela contenente medium più diverse diluizioni di reagente di trasfezione (MIRUS) e la si è incubata per 10 minuti a temperatura ambiente. Alla miscela precedentemente preparata è stato aggiunto un microgrammo di DNA e l'incubazione è durata 20 minuti a temperatura ambiente. La miscela contenente il DNA è stata aggiunta alle cellule e lasciata in incubazione per due giorni a 37°C.

## **2.27. Immunofluorescenza su cellule**

Dopo aver lavato le cellule con PBS 1X, si è proceduto con la fissazione in paraformaldeide 4% in PBS 1X. Le cellule sono state nuovamente lavate nel buffer e incubate in una soluzione di Blocking per 20' a temperatura ambiente. Un anticorpo anti-Flag è stato usato ad una concentrazione di 1:100 e incubato nelle cellule per un'ora. Per allontanare l'anticorpo le cellule sono state lavate con una soluzione TBS triton 0.1%. L'incubazione in presenza dell'anticorpo secondario è stata effettuata utilizzando un anti-rabbit 488, dal momento che il primario anti-

Flag disponibile era in coniglio. L'incubazione è stata effettuata al buio per evitare la precipitazione della fluorescenza, per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo ulteriori lavaggi in TBS triton 0.1%, le cellule sono state sottoposte ad un'ulteriore incubazione con DAPI per evidenziare i nuclei. Il DAPI è stato usato a una concentrazione di 1:10000. Dopo aver lavato le cellule con H<sub>2</sub>O, si è proceduto al montaggio dei vetrini contenenti le cellule con la soluzione Mounting Media. L'osservazione e le immagini sono state ottenute mediante utilizzo di un microscopio composito a fluorescenza.

## **2.28. Immunoprecipitazione e spettrometria di massa**

Per ottenere informazioni circa il legame della proteina soul2 con altre proteine, si è proceduto con esperimenti di immunoprecipitazione e spettrometria di massa.

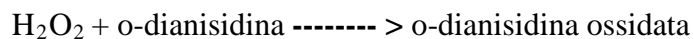
Le cellule sono state transfettate come precedentemente descritto (*vedi Paragrafo 2.26.*) e cresciute in piastra con liquido di Dulbecco a 37°C per due giorni. Un kit di estrazione e immunoprecipitazione della Active Motif è stato utilizzato seguendo il protocollo suggerito dal kit stesso. Le cellule sono state prima lavate con il buffer PBS/Inhibitors e poi sono state estratte utilizzando il buffer di lisi Complete Whole-cell Lysis Buffer. Si è così proceduto alla co-immunoprecipitazione utilizzando 5µg di anticorpo combinato con 500µg di cellule estratte. Successivamente a lavaggi per allontanare l'anticorpo, le cellule sono state incubate con proteine G ancorate magneticamente a “beads”. Dopo ulteriori lavaggi per allontanare le proteine G, le proteine estratte sono state caricate su gel di poliacrilammide per osservare la presenza di eventuali proteine. Un'altra parte è stata sottoposta a esperimenti di Western Blotting per verificare ulteriormente la presenza della proteina Soul2.

## **2.29. Colorazione dell'emoglobina embrionale con benidina**

Gli embrioni microiniettati con il morfolino specifico di *soul2*, sono stati tenuti a 28°C in H<sub>2</sub>O di fecondazione e lasciati sviluppare. Allo stadio di 48 hpf, sono stati incubati in una soluzione di benidina (620µg/mL), NaOH (10mM a pH 4.5) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.65%), sostanza che permette di rilevare la quantità di emoglobina

prodotta colorandola di rosso scuro. L'esposizione è durata 5 minuti, dopodiché l'emoglobina contenuta nel sangue ha subito una reazione cromatica più o meno forte a seconda della quantità di o-dianisidina ossidata che si è legata all'emoglobina.

Il perossido d'idrogeno presente nella miscela si è ossidato in una reazione catalizzata da una perossidasi, l'o-dianisidina, che nella sua forma ossidata è colorata e presenta un massimo di assorbimento a 440 nm:



In seguito, gli embrioni sono stati lavati in embryo medium, fissati in paraformaldeide 4% in PBS 1X e conservati in glicerolo al 70% in PBS 1X. Gli embrioni sono stati successivamente osservati al microscopio e fotografati.

### **2.30. Esposizione degli embrioni a succinil acetone**

Embrioni incubati a 28,5°C in embryo medium, sono trattati con succinil acetone, sostanza che inibisce l'espressione del gene ALA-D (amino levulinato deidratasi) e che quindi blocca la biosintesi di eme, 7.5mM o 15mM diluito in MBS 1X a inizio somitogenesi (11 hpf) e a somitogenesi più avanzata (13 hpf).

Una parte degli embrioni utilizzata come controllo è stata incubata in MBS 1X senza succinil acetone.

Si è proceduto con l'osservazione del corretto sviluppo degli embrioni fino alle 24 e 48 hpf, dopo di che gli embrioni sono fissati in paraformaldeide 4% in PBS 1X e conservati in metanolo 100% a -20°C. Gli embrioni sono stati osservati e fotografati al microscopio Zeiss precedentemente descritto.

### **2.31. Purificazione di proteine**

Due anticorpi monoclonali di coniglio sono stati acquistati dalla società Primm srl (Milano) per le proteine soul1 e soul2.

I due anticorpi sono stati purificati a partire dall'antigene ottenuto mediante l'unione del peptide sintetico fornito dalla ditta con la glutaraldeide legata alla

proteina BSA, a formare un complesso:

peptide – glutaraldeide – BSA

Il complesso è stato incubato per 2 ore a temperatura ambiente. Una membrana Hybond-P è stata preparata ed equilibrata con 100% MeOH per 5 minuti e MeOH 50% in PBS 1X per altri 5 minuti. Successivamente la membrana è stata incubata con l'antigene per un'ora a temperatura ambiente. Si è proceduto con la preparazione dei sieri di Soul1 e Soul2 da purificare (2mL di siero in 8mL di PBS 1X). Dopo ripetuti lavaggi in PBS 1X, la membrana è stata incubata nell'anticorpo per 30' a temperatura ambiente. Per staccare l'anticorpo dalla membrana, si è proceduto con l'incubazione in 0.1 M citrato fosfato a pH 3. Il tampone è stato prelevato e portato subito a pH 7.4 con Tris 2M e conservato a -20°C.

### **2.32. Saggio Elisa**

Il test Elisa (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) è un saggio biochimico che permette di rilevare la presenza di un antigene, grazie all'uso di uno specifico anticorpo. Dopo aver rimosso gli antigeni dalla piastra e averli conservati a -20°C, i pozzetti sono stati riempiti di una soluzione di blocking al 10% e incubati per 30 minuti a temperatura ambiente in agitazione. Dopo ripetuti lavaggi in PBS 1X per allontanare la blocking, si è proceduto con l'incubazione in diverse concentrazioni di anticorpo primario per 3 ore a temperatura ambiente. Dopo aver allontanato l'anticorpo primario con lavaggi in PBS 1X, è stato aggiunto un anticorpo secondario, anti-rabbit nel caso specifico, e lasciato in incubazione per un'ora. Dopo aver allontanato l'anticorpo secondario con diversi lavaggi in PBS 1X, si è proceduto con la detection utilizzando l'ABTS, un substrato di colore verde che rivela la presenza dell'antigene. Opportuni controlli sono stati utilizzati.

### **2.33. Analisi mediante Western blotting**

Per testare la specificità delle proteine, si è effettuata un'analisi mediante Western blotting. In pratica le proteine sono state separate mediante un gel di poliacrilamide contenente SDS per denaturarle. Le proteine sono state trasferite

dal gel ad una membrana (Hibond P) mediante blotting. Il principio del “sandwich” si basa sul legame all'antigene presente sulla membrana da parte di un anticorpo non marcato (anticorpo primario), per cui dopo aver incubato la membrana in presenza di latte in polvere (milk powder) 5% per 30 minuti, si è proceduto con l'incubazione negli anticorpi primari in diluizioni da 1:500 a 1:2000 a 4°C per tutta la notte. Per evidenziare il primo anticorpo è stato usato un secondo anticorpo marcato (anticorpo secondario), nel caso specifico anti-rabbit, ad una concentrazione di 1:10000 per un'ora a temperatura ambiente. Dopo diversi lavaggi per allontanare l'anticorpo secondario, si è proceduto con la rivelazione, mediante una soluzione ECL, su lastra.

### **2.34. Immunoistochimica**

Dopo reidratazione degli embrioni e lavaggi in PBS 1X per allontanare il metanolo, essi sono stati incubati in 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBT per eliminare l'attività delle perossidasi endogene. Successivamente gli embrioni sono stati permeabilizzati con PK per diversi minuti a seconda dello stadio di sviluppo e post-fissati in paraformaldeide 4% in PBS 1X. Dopo ripetuti lavaggi in PBS 1X, gli embrioni sono stati incubati in 300µL di anticorpo primario diluito in 3% NGS (normal goat serum) in PBT per tutta la notte.

Gli embrioni sono stati incubati prima nell'anticorpo secondario diluito 1:200 in 3% NGS e successivamente nel complesso A-B (avidina – biotina), presente nel kit Vectastain utilizzato. Dopo ulteriori lavaggi in PBT, si è proceduto con la rivelazione del segnale mediante DAB (di-amino-benzidina). Gli embrioni sono stati lavati, montati ed esaminati al microscopio.

### **2.35. Apoptosi**

L'apoptosi è uno dei principali tipi di morte cellulare programmata negli organismi multicellulari e comprende una serie di eventi biochimici che porta la cellula a presentare determinate caratteristiche morfologiche e infine alla sua morte. Per valutare se i cambiamenti morfologici del pronefro dei morfanti di *soul2* era dovuto a morte cellulare, è stato utilizzato il kit ApopTag (ApopTag Peroxidase In

Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon Cat# S7100). E' stata usata la fosfatasi alcalina coniugata con la digoxigenina invece che la perossidasi fornita dal kit. Gli embrioni morfanti sono stati fissati in paraformaldeide come da protocollo e disidratati in EtOH. Successivamente gli embrioni sono stati incubati in una soluzione di bleaching costituita da 2X SSC + 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1% formammide. Dopo ripetuti lavaggi in PBS 1X, sono stati sottoposti al trattamento con PK e post-fissati in paraformaldeide per 20 minuti. Successivamente a lavaggi in PBS 1X, gli embrioni sono stati incubati in Equilibration Buffer fornito dal kit. Sono stati poi lasciati tutta la notte in Reaction Buffer + l'enzima TdT. Dopo aver rimosso la soluzione di reazione, si è proceduto con lavaggi in tampone maleico (MAB) e all'incubazione in una soluzione di blocking (Boehringer #1096176) con una concentrazione di anticorpo anti-DIG (Roche) pari a 1:2000 per 4 ore. Gli embrioni sono stati lavati abbondantemente con MAB e il segnale è stato rivelato mediante incubazione in AP buffer più NBT/BCIP e monitorati al microscopio Zeiss precedentemente descritto.

## **Tabelle delle soluzioni**

### Tamponi impiegati per reazioni di Marcatura terminale, PCR e Ligasi

#### **Tampone della T4 Polinucleotide Chinasi (10x):**

Tris-HCl (pH 7,5)	500 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM
DTT	50 mM
Spermidina	1 mM

#### **Tampone di Sintesi (10x):**

Tris-HCl (pH 8,4)	200 mM
KCl	500 mM

#### **Tampone di Ligasi (10x):**

Tris-HCl (pH 7,6)	200 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM
DTT	50 mM
BSA	500 mg/ml

### Terreni di Coltura

#### **LB – Mezzo di Luria Bertani (1 l)**

NaCl	10 gr
Bacto-Tryptone	10 gr

Estratto di lievito	5 gr
---------------------	------

### **SOB**

Tryptone	20 gr
----------	-------

Estratto di lievito	5 gr
---------------------	------

NaCl 5 M	2 ml
----------	------

KCl 1 M	2,5 ml
---------	--------

H <sub>2</sub> O	fino ad 1 litro
------------------	-----------------

### **SOC**

Aggiungere al SOB per un litro :

MgSO <sub>4</sub> 1 M	10 ml
-----------------------	-------

MgCl <sub>2</sub> 1 M	10 ml
-----------------------	-------

Glucosio 1 M	20 ml
--------------	-------

### Soluzioni per elettroforesi e per solubilizzare il DNA plasmidico

#### **TBE 10x (1 l)**

Tris	108 gr
------	--------

Acido Borico	55 gr
--------------	-------

EDTA 0,5 M (pH 8,0)	40 ml
---------------------	-------

#### **TE**

Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
-------------------	-------



EDTA	1 mM
------	------

Soluzioni impiegate per mini- e maxi-preparazioni di DNA plasmidico

**Tampone QBT**

NaCl	0,75 M
MOPS (pH 7,0)	50 mM
Etanolo	15 %
Triton X-100	0,15 %

**Tampone QC**

NaCl	1 M
MOPS (pH 7,0)	50 mM
Etanolo	15 %

**Tampone QF**

NaCl	1,25 M
MOPS (pH 8,2)	50 mM
Etanolo	15 %

Tamponi impiegati per la trascrizione *in vitro*, l'immunorivelazione e l'ibridazione *in situ*

**Tampone 1 -MBT-**

Acido maleico (pH 7,5)	0,1 M
------------------------	-------

NaCl	0,15 M
------	--------

### **Blocking Solution**

Blocking solution preparata secondo protocollo Thisse

PBT / 2% sheep serum / 2 mg per ml BSA

### **Tampone 2**

"Blocking stock solution" diluita 1:10

### **Tampone 3**

Tris-HCl (pH 9,5)	100 mM
-------------------	--------

NaCl	100 mM
------	--------

MgCl <sub>2</sub>	50 mM
-------------------	-------

### **Tampone di Diluizione**

H<sub>2</sub>O DEPC : SSC 20x : Formaldeide (5:3:2)

**NTP** (Nucleotidi Trifosfati)

ATP	10 mM
-----	-------

CTP	10 mM
-----	-------

GTP	10 mM
-----	-------

UTP	6,5 mM
-----	--------

DIG-UTP	3,5 mM
---------	--------

**Tampone di Trascrizione**

Tris-HCl (pH 8,0)                      400 mM

MgCl<sub>2</sub>                                      60 mM

DTT                                        100 mM

Spermidina                              20 mM

**Soluzione di Ibridazione**

Formammide                              50 %

SSC                                        5x

tRNA                                        500 µg/ml

Acido citrico fino a pH 6,0

Tween 20                                  0,1 %

Eparina                                    50 µg/ml

**Staining buffer (tampone di colorazione)**

NaCl                                        0,5 M

Tris-HCl (pH 8,0)                      10 mM

EDTA                                       5 mM

Tween 20                                  0,1 %

**Tampone AP**

NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	60 mM
Tris-HCl (pH 9,5)	100 mM
Tween 20	0,1 %

**PBS (Tampone Salino Fosfato)**

NaCl	200 mM
KCl	3 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM

Soluzioni per gli embrioni**Stock salt solution 1l**

Instan ocean sea salts	40g
H <sub>2</sub> O distillata	1l

**Embryo medium 1l**

Stock salts solution	1,5 ml
H <sub>2</sub> O distillata	998,5 ml
Blu di metilene	0,1%

**MBS 10X stock solution**

NaCl	0,88M
KCl	10mM
MgSO <sub>4</sub>	10mM
HEPES	50mM
NaHCO <sub>3</sub>	25mM

**MBS 1X**

MBS stock	1X
CaCl <sub>2</sub>	7mM
Gentamicina	50 µg /ml

**Abbreviazioni**

**DEPC:** Dietilpirocarbonato

**SSC:** Sodio Salino Citrato

### 3. RISULTATI

#### 3.1. Analisi delle sequenze degli ortologi *soul1*, *soul2*, *soul3* e *soul4* di *Zebrafish*

La struttura cromosomica dei quattro omologhi di *Zebrafish* dei geni *soul* è riportata in **Fig.18**. Le sequenze codificanti e le proteine corrispondenti mostrano, rispettivamente, una lunghezza di 573bp e 191aa per *soul1*, 597bp e 199aa per *soul2*, 597bp e 198aa per *soul3* e 1172bp e 227aa per *soul4*. Di seguito sono state riportate le sequenze nucleotidiche della regione codificante a partire dall'ATG di inizio e le relative sequenze amminoacidiche a partire dalla metionina di inizio.

##### *soul1*

atgcttaaagccatcggtcaaactctgttttctactggactccaaaaccccaaatacacagctcaggagagtaagggtg  
atgactatgaagtccgcacctaccaagcaacaaactgggtaagcacagtgtgactggcatggagcaggaccaagc  
catgagcacaggctttagaagactcttcaaatacattcagggcagtaatgaaaagaagagtaagggtggagatgacga  
caccggtgagttgtttgattgaccctggagcgggacctgcatgtgaaagcaccttcactgtgtcctttacatccctgag  
gaacatcaagctgacctcccaaaccactgaccagatgttttatcgagagcagaaaagagctcactgcattcgta  
ggaccttggtggctttgctaacagtgaagctgctgtgaggagattctcaagctcatagaaagcctcaagagggatg  
gcatgaaattcaagaggcaccatattaccgagcaggatacgacagtccttcaaactcaccggccgcaggaacga  
agtctggctcatcaaagatgaggagtaa

##### Proteina:

MLKAIGQTLFSTGLQNPKYTAQESKGDDYEVRTYQATN WVSTVVTGMEQ  
DQAMSTGFRRLF KYIQGSNEKKSKVEMTTPVSCLIDPGAGPACESTFTVSF  
YIPEEHQADPPKPTDPDV FIESRKELTAFVRTFGGFANSESCCEEILKLIESLK  
RDGMKFKEAPYYRAGYDSPFKLTGRRNEVWLIKDEE

##### *soul2*

atggcgatgtatgtggcttctgctctgtgtctcctgtcggactgtatgtttcacagctacagaatgttggaagcacct  
ggttttgcatcaaaaaggactgccctgtgtacactgtggtaaaccaatatgaaatagaagaacgcaactatgaaatgag  
caactggattaccaccgatattttaagcacaggcaaggatgatgtatcaactggattttggaactatactattttattcaa



**Proteina:**

MAQPIQQITSNNDGAHTREPVPYTLITRKEKCGEVLYEKRHYEKAPSTVFF  
MHERTLKNRLFYFFSIVMNM TVDLCPAGSYLGMTIPIVTVVRTDESNTTLS  
RAVTVAYYLPPTYQNDPPRPYDPDILIEQWPAAIVYSRSFTGATNELSILHEL  
RSLVEALDCPALGSDSFIVAGYTNPAAAH RHNEIWFLERP

***soul4***

atgcgcagtatgaggctgtaaaatccccagcgctttaagctgtgtcgtgcgtttgtgtgtctgtcggagcttctggtga  
cgtcaggacgatggctctgatcccttcgaggatctggagggattggatgacgagcaggtggacgatgatgtcactga  
cagctctgagccaatggatgatgaggagcaggaccgaatgtacgccactggcagggcgtgggacgaacgcatca  
cgtggcggtgcctacagatgagagcaccaatagaagagatgacgcggaggaaccagagcgcgatgtgtttgtact  
gtgggggaaaccggagcaccagacgaaacccacaccaacacggcgagaacatgcaaactccacactgaaaccc  
caactgttcagccgaggctcgaactccgctaaccactgagccactgttttagccgtctcaatcccagatatgccttga  
acttcattaaggggatctggatctgttggctcatgtcagattgttgaaaatgtcagcaaaatactgagccaaaattgacttt  
attaatgaaagcagcacactttttgttagttgtctgtaaaatgcttgatttaagagttttcaatatttagactcgaactg  
gacaaaaactgtgtgtttatcagtctaaagcacagatgtcgggctcgggtcctggagggccgcagctctgcacagttt  
agttccaaccctaattaaacacacctgatcaaaactaattgagtccttcaggcttgttgaaacctacaggtgagtgtgttg  
gagcaggggttggaactaaactgtgcggggcttcggccctccagggttgagtttgacacccctgctctaaagcatcca  
gcatcagtgcattttgattttgtttgatgtccacacatcgggcgactctttacagcacagtttgagtattgttgaacatga  
ttccttgcttttgacatgttaatggcttaggtgtacttgctgtcacagtattttaaaaacctgcactccccttcagcgct  
gtaataataatgataataaagttatttatagacatctggcgtatgaacagtagcttgacgtgcttttcagacagtttaata  
aatgtatgcaataaacaataaagtttttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

**Proteina:**

MDDEEQDRMYAHWQAVGRTHHVAVPTMRAPIEEMTRRNQSAEREQVPF  
VTISRHEKLGEVLYEERVYPPGKWACVSKADALYEQSI SNGFMKLMRFICK  
ENSTGRYLGMSVPVNEITMADDGTNFMKDVLTAYYLP AEYQDVPPQPTD  
PDIHIIQRDSIRVITRVFFGTTTEETISRQISNLWELLG NSEDLLRDRYMIAYV  
ENPGVPQRRNEIWFIRRG

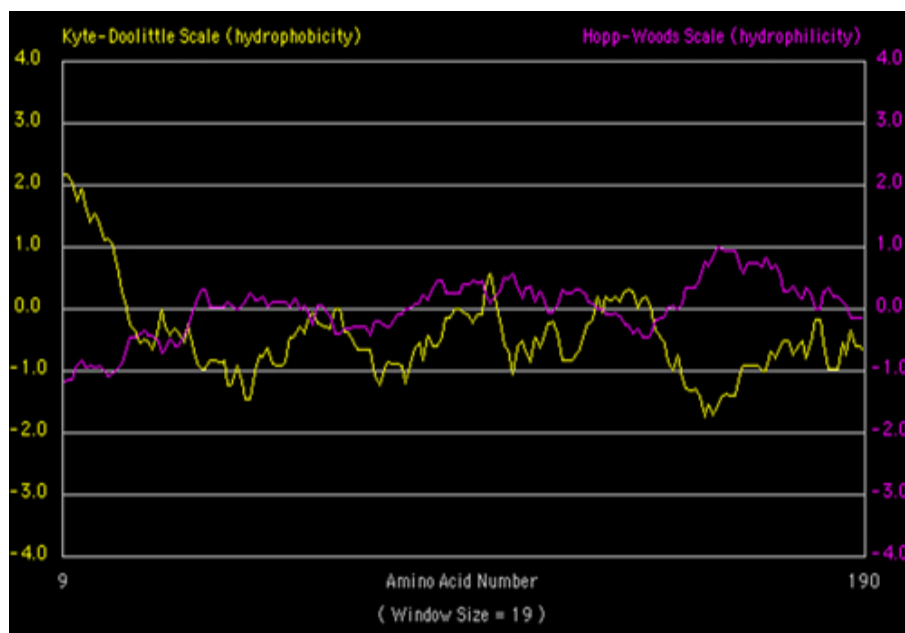
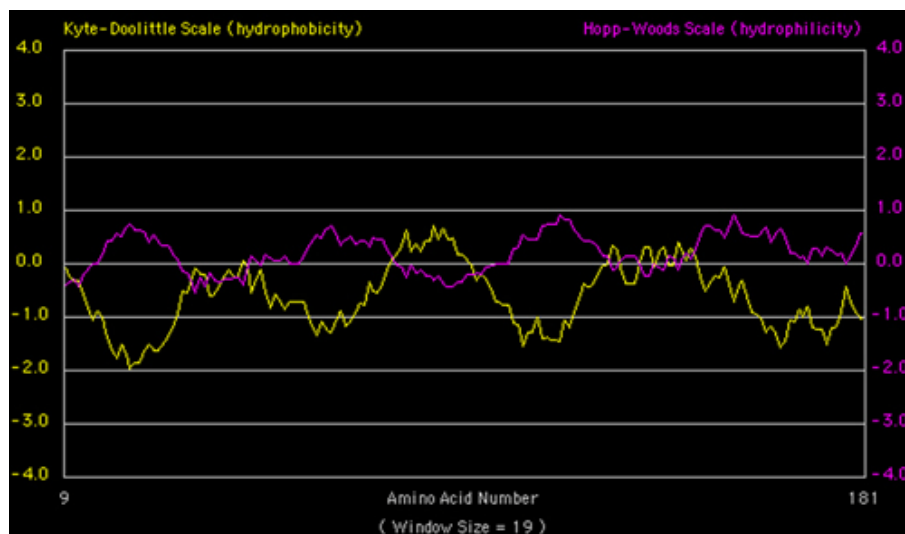
Dall'allineamento delle proteine soul individuate in diverse specie è stato possibile riconoscere alcuni motivi strutturali conservati (**Fig.16**), grazie anche all'utilizzo del software LOGO (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>), utile per valutare il



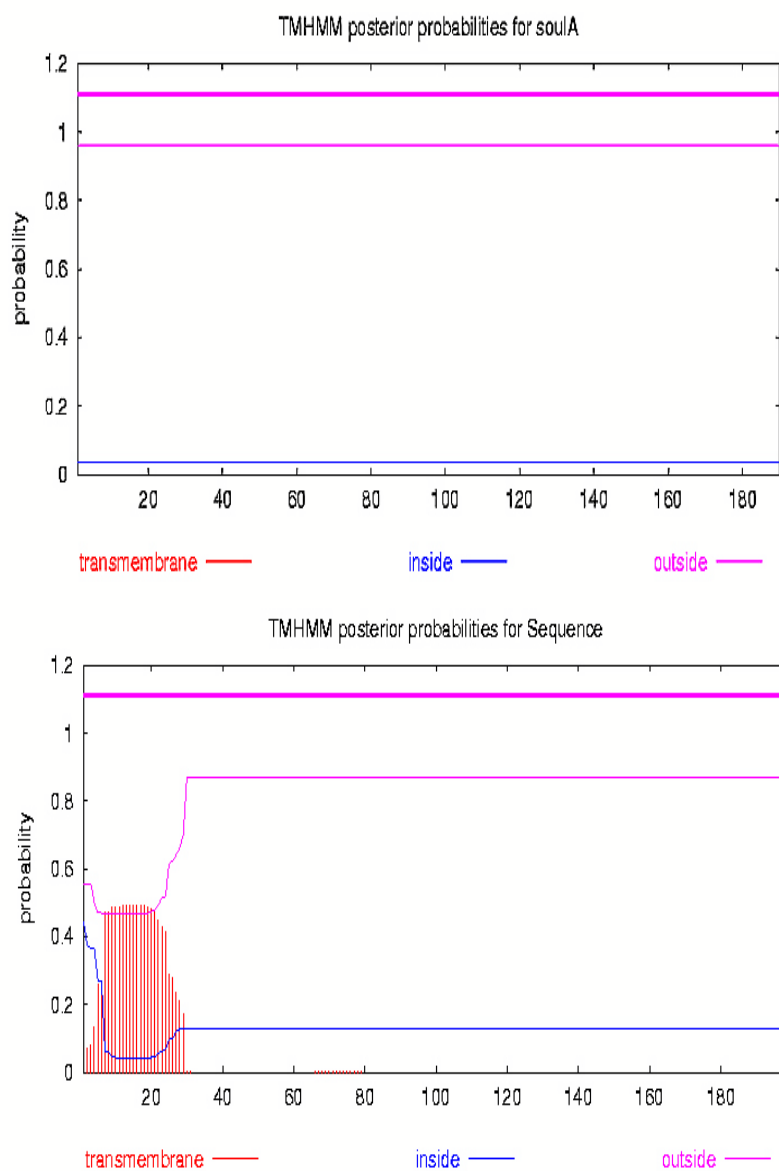
grado di conservazione degli amminoacidi per ogni posizione della sequenza laddove le dimensioni della lettera indicativa dell'amminoacido è direttamente proporzionale alla frequenza dello stesso. E' stato così possibile osservare la presenza di diversi amminoacidi conservati lungo l'intera sequenza. In particolare sono state individuate sei proline in posizione 79, 97, 125, 134, 136 e 208 e inoltre, è risultato conservato il dominio idrofobico solo per due coppie di amminoacidi, una metionina e una treonina in posizione 76 e 77, ed una prolina ed una valina in posizione 79 e 80. Quasi tutte le proteine presentano un tetrapeptide N-E-V\I-W\M all'estremità 3' (**Fig.17**).

Alla ricerca di possibili domini strutturali di natura funzionale, si è proceduto con un'analisi bioinformatica delle sequenze dei geni *soul*, ottenendo un risultato negativo. Attraverso l'utilizzo di programmi è stato possibile predire la presenza di domini transmembrana (TMHMM e TMAP nel pacchetto EMBOSS) (**Fig.18**). Questi programmi hanno evidenziato la presenza di un dominio aminoterminale in posizione 4-32 del fattore *soul2* e per confermare ulteriormente questo dato è stato utilizzato, inoltre, un programma Kyte-Doolittle, che attraverso un grafico di idrofilicità-idrofobicità ha confermato l'elevata idropatia del medesimo settore (**Fig.19**).

Per dimostrare i rapporti filogenetici tra le proteine *soul*, ci si è serviti del programma Neighbour-Joining applicandolo all'intero set di sequenze proteiche individuate dai database. Le medesime sequenze sono state allineate utilizzando il programma ClustalW. La cladistica molecolare delle proteine *soul* ha generato tre principali cladi filogenetici. Il primo raggruppamento raccoglie le proteine *soul* di origine batterica, oltre ad altre di origine vegetale; il secondo raggruppamento contiene le proteine *soul* di vari organismi animali e vegetali, senza particolari limitazioni sistematiche; il terzo, infine, è composto dalle proteine *soul* dei Cordati (**Fig.20**).

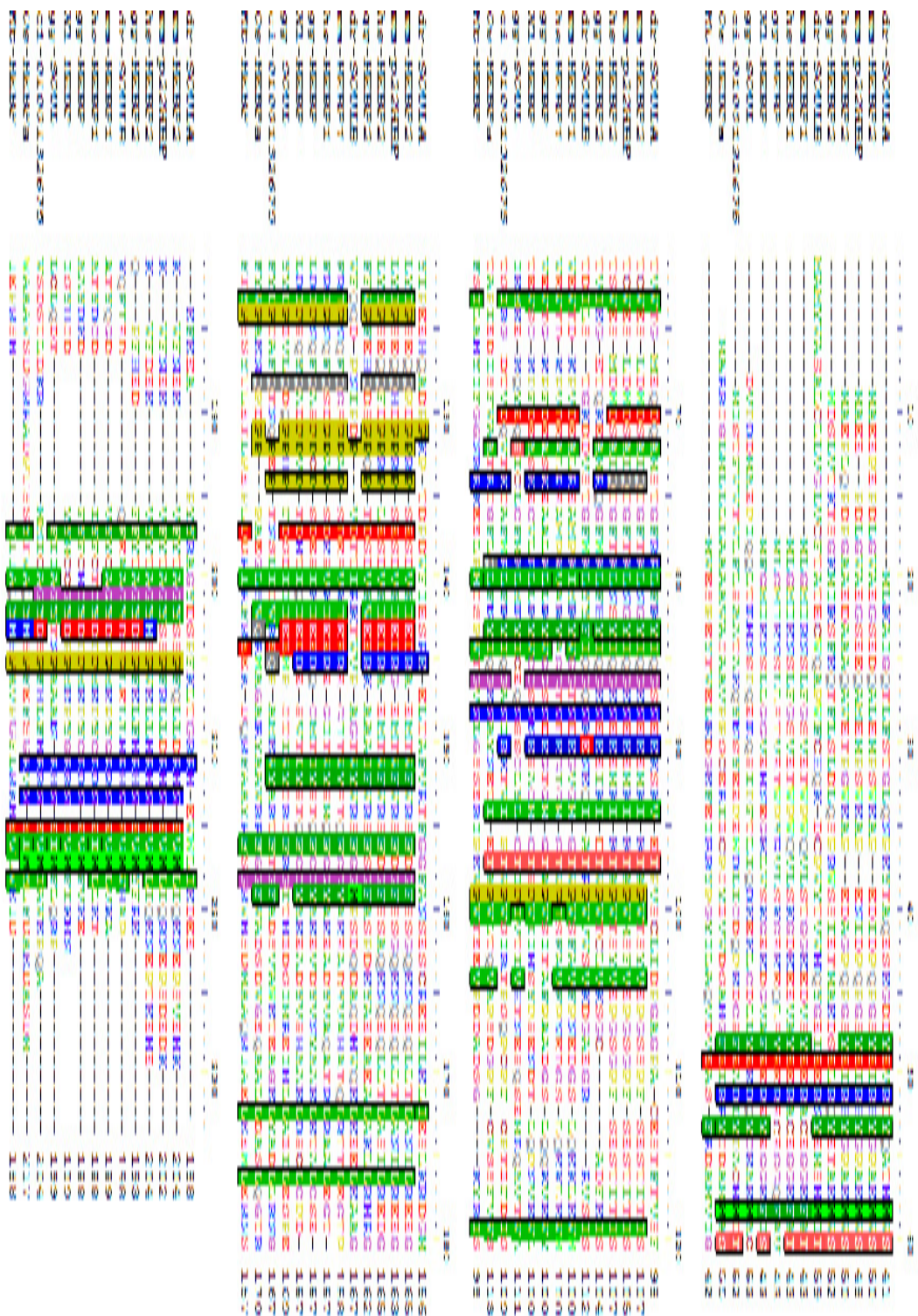


*Fig.16 Profilo di idropatia di soul1 (in alto) e di soul2 (in basso).*



***Fig.17 Profilo idropatico di soul1 (in alto) e soul2 (in basso).***





**Fig.19 Allineamento delle proteine soul mediante ClustalW.**



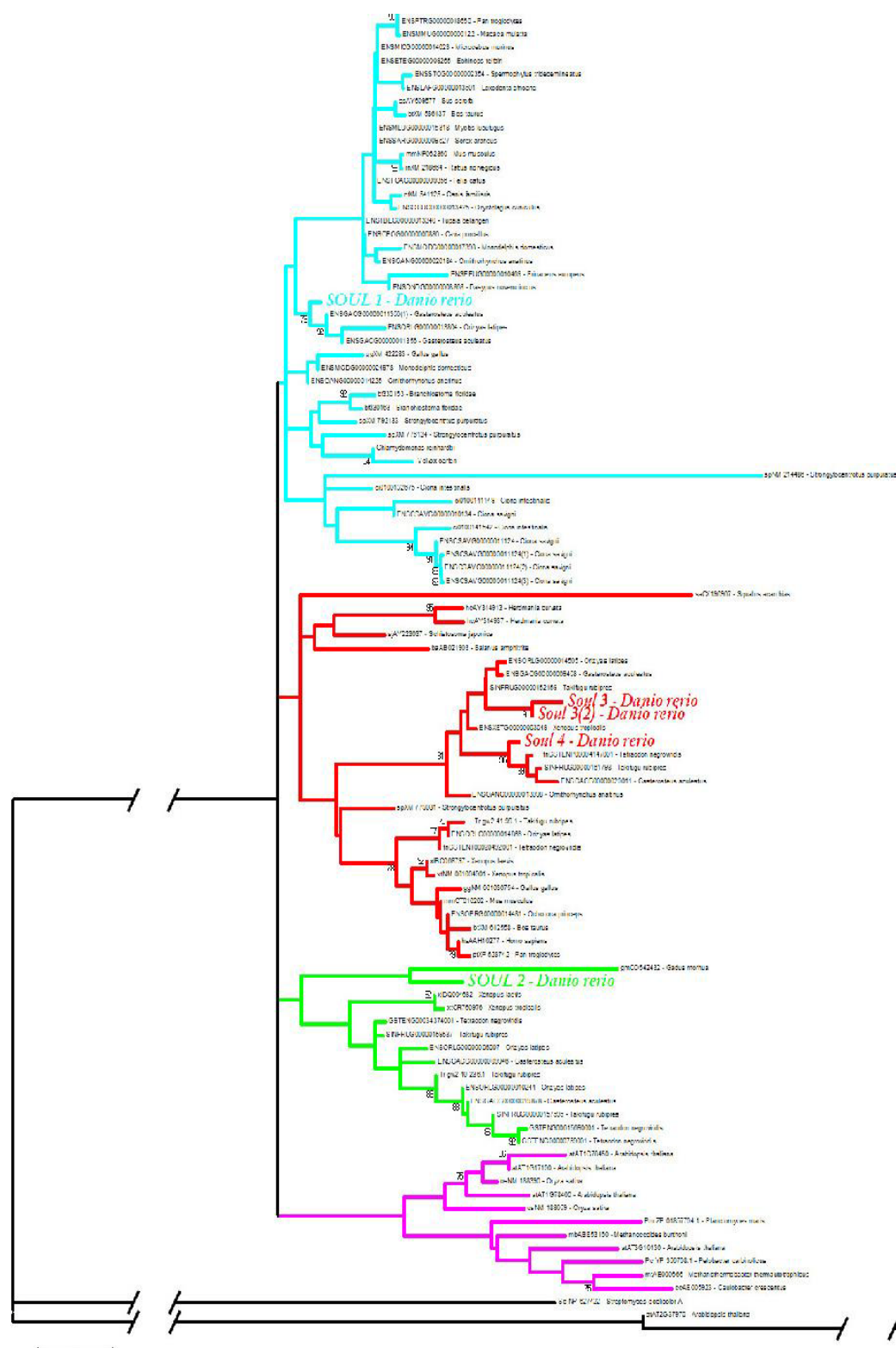


Fig.20 Albero filogenetico dei geni soul

### **3.2. Analisi dell'espressione degli orologi *soul* durante lo sviluppo di *Zebrafish***

L'ibridazione *in situ*, utilizzando sonde specifiche corrispondenti all'inserimento di cDNA dei geni di interesse, *soul1*, *soul2*, *soul3* e *soul4*, ha mostrato il profilo di espressione spazio-temporale di ciascun gene in diversi tessuti e organi di embrioni interi di *Zebrafish* a vari stadi di sviluppo e in ovario e rene di adulto. Sonde ad RNA antisenso e senso, marcate con digossigenina (Dig11-UTP), di lunghezza compatibile con una buona specificità di ibridazione sono state sintetizzate per i quattro geni *soul*.

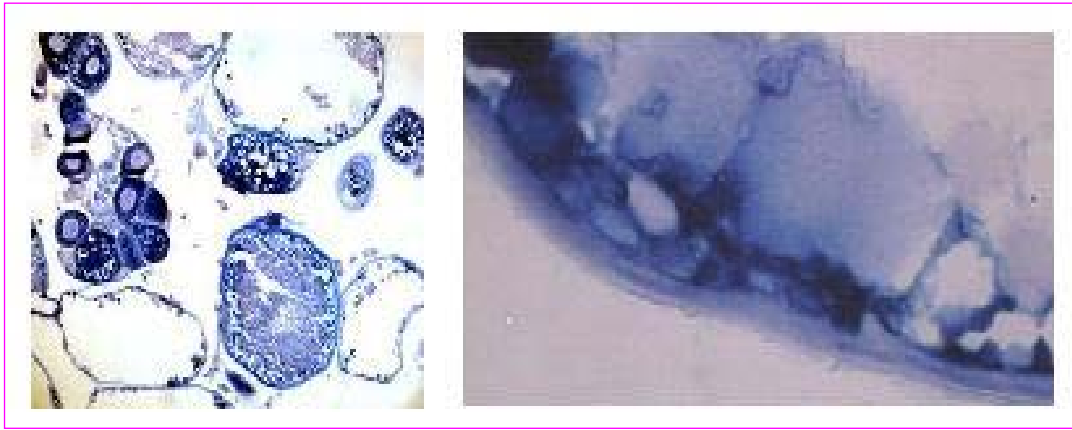
#### **3.2.1. Profilo di espressione di *soul1***

L'ibridazione *in situ* su sezioni di ovario di *Zebrafish* adulto ha confermato la presenza del trascritto di *soul1* (**Fig.21**). In particolare l'mRNA è risultato essere presente in tutti gli stadi di differenziamento degli ovociti, da quelli immaturi (OI) nei quali il segnale è più intenso e omogeneamente distribuito nell'ooplasma, a quelli maturi nei quali il segnale è circoscritto alla zona periferica, suggerendo un eventuale segnale associato alla membrana cellulare (MC).

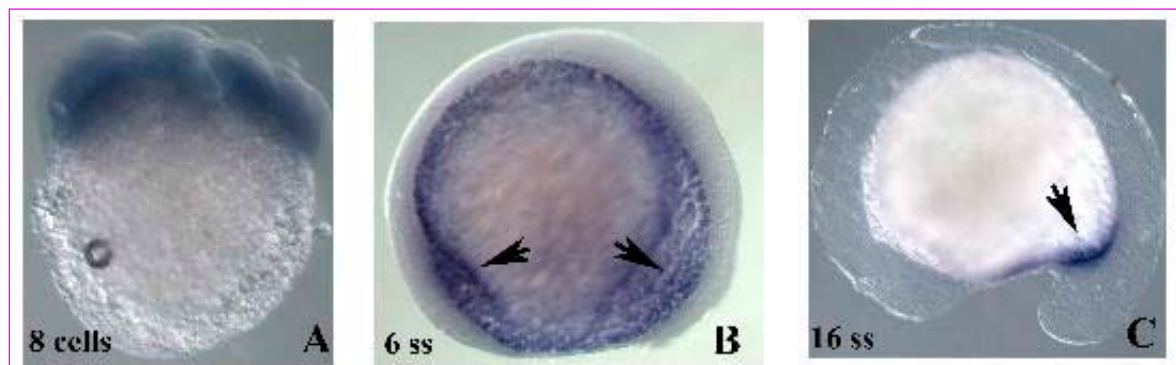
Durante lo sviluppo embrionale, è emersa l'espressione di *soul1* fin dai primi stadi di sviluppo e infatti dallo stadio di 1 cellula allo stadio di 8 cellule, l'mRNA endogeno è distribuito nel citoplasma di tutti i blastomeri, con un'evidente gradiente verso il polo animale dei blastomeri, in prossimità dello strato sinciziale che separa l'embrione dal vitello. Nel periodo di gastrulazione il segnale scompare progressivamente dalle cellule del polo animale e appare circoscritto al margine della gastrula, nel territorio endomesodermico posto in prossimità della regione equatoriale. La formazione dell'organizer, centro embrionale di induzione degli assi corporei, corrispondente allo stadio di shield in *Zebrafish*, coincide con un ulteriore cambiamento nella distribuzione dell'mRNA di *soul1* che appare concentrato nelle regioni rostrale e caudale. Durante la somitogenesi il segnale è presente solo all'interno della regione caudale dell'estensione del vitello. Sezioni trasversali di questa regione allo stadio di 25 somiti mostrano come l'mRNA sia concentrato perifericamente lungo l'intera circonferenza dell'estensione del

vitello. Allo stadio di 24 hpf, nuovi domini di espressione sono evidenti nel sistema nervoso centrale, in particolare nel mesencefalo dorsale (tetto), e nei somiti ad eccezione di quelli più anteriori. Inoltre, allo stesso stadio di sviluppo, è rilevabile un ulteriore dominio di trascrizione in cellule ematiche localizzate nella regione anteriore e ventrale del vitello (*Fig.22*).

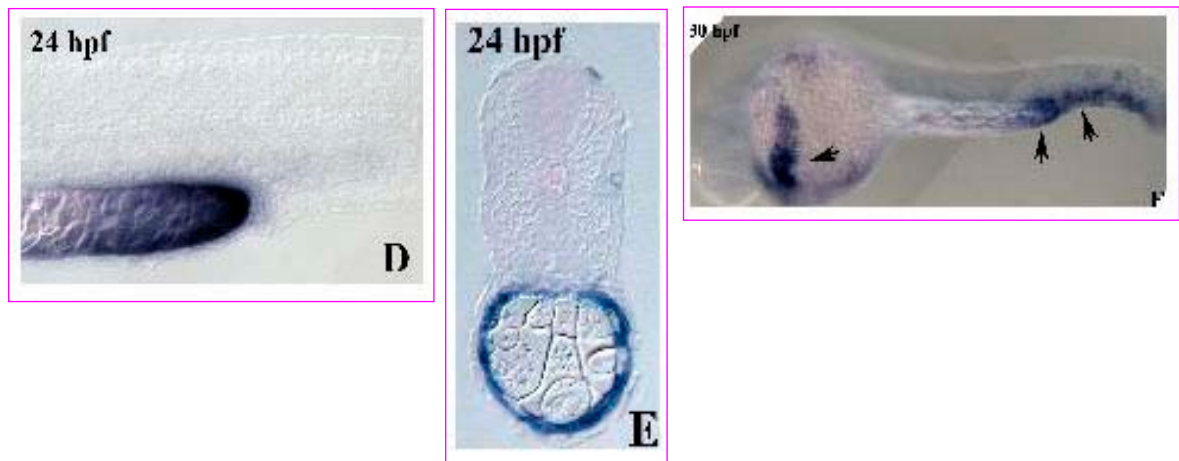




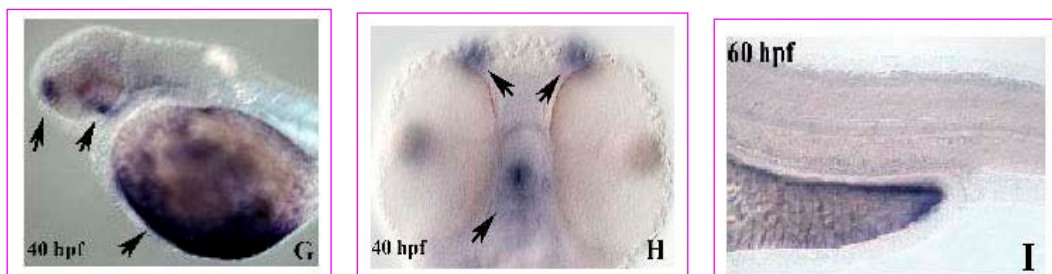
*Fig.21 mRNA di soul1 in ovario.*



*Fig.22 Ibridazione in situ whole-mount per soul1 in embrioni di Zebrafish a diversi stadi di sviluppo. A: Espressione nell'embrione a 8 cellule; B: Espressione nello strato sinciziale del vitello (YSL) a 6 ss. C: Espressione nello strato sinciziale del vitello (YSL) a 16 ss.*



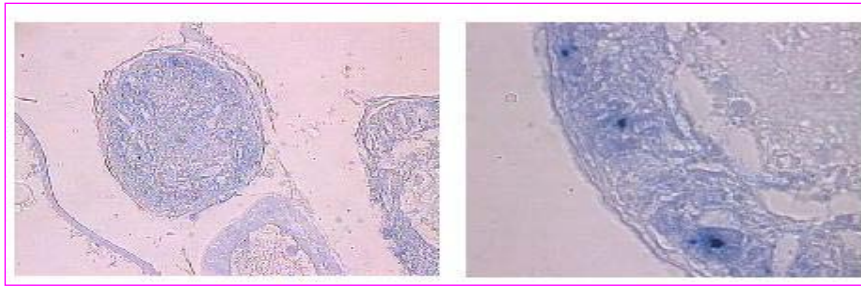
*Fig.22 C, D, E (sezione): Espressione nell'estensione del vitello (YE) dalle 16 alle 24 hpf; F: Espressione negli isolotti sanguigni sul vitello, estensione del vitello e cellule del sangue posteriori a 30 hpf.*



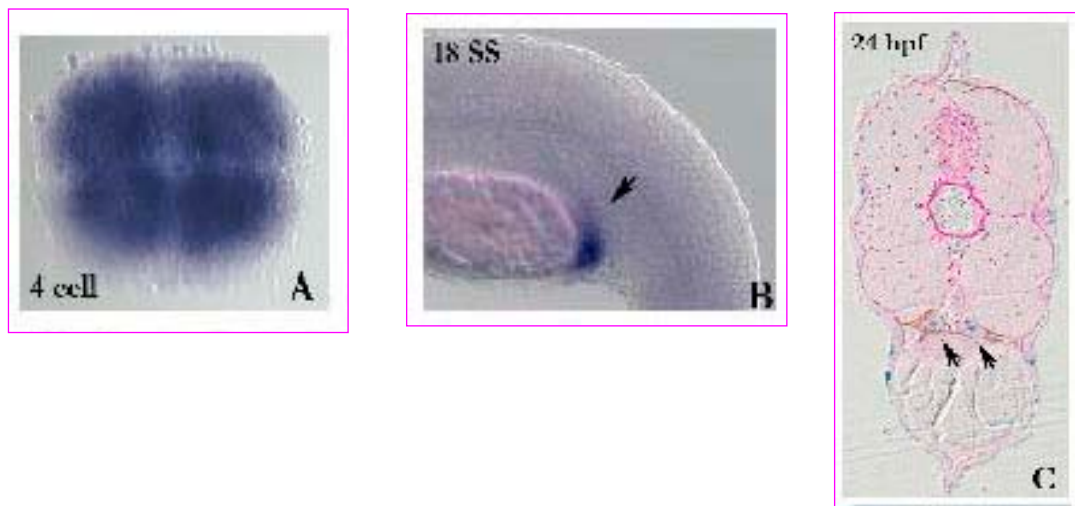
*Fig.22 G: Espressione nei placodi olfattivi, ghiandola pineale e strato sinciziale del vitello a 40 hpf; H: Espressione nei placodi olfattivi e nella ghiandola pineale; I: Espressione nell'estensione del vitello a 60 hpf.*

### 3.2.2. Profilo di espressione di *soul2*

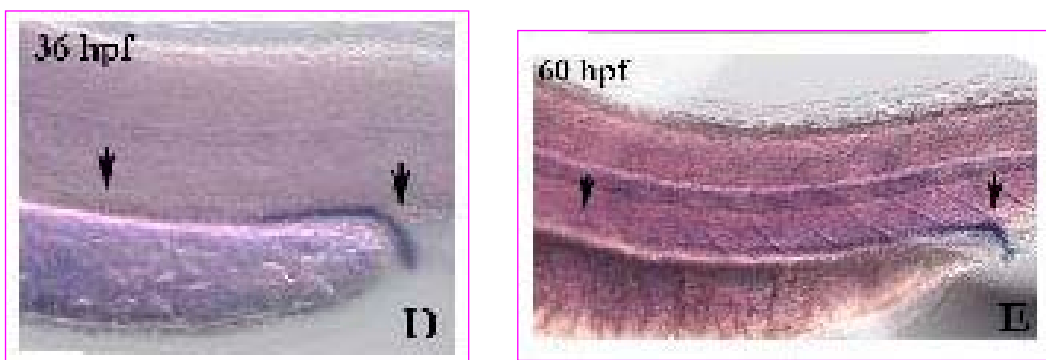
Il trascritto di *soul2* nell'ovario di *Zebrafish* adulto è distribuito uniformemente in tutto l'ooplasma degli ovociti immaturi, contrariamente a quanto osservato negli ovociti maturi dove è risultato circoscritto alla membrana cellulare (**Fig.23**). Nel corso dello sviluppo embrionale l'espressione di *soul2* è evidente in diversi territori citologici ed embrionali, tra cui i placodi olfattivi e la regione degli archi faringei. Interessante è risultata la presenza del trascritto nella zona antero-ventrale del vitello allo stadio di 24 hpf, zona marcante le cellule ematopoietiche. Inizialmente ristretto alla regione della cloaca, l'espressione di *soul2* si estende anteriormente alla zona del PD allo stadio di 24 hpf fino alla regione del DL a 48 hpf. Il segnale nel corso dello sviluppo regredisce posteriormente alla zona del PD allo stadio di 72 hpf (**Fig.24**).



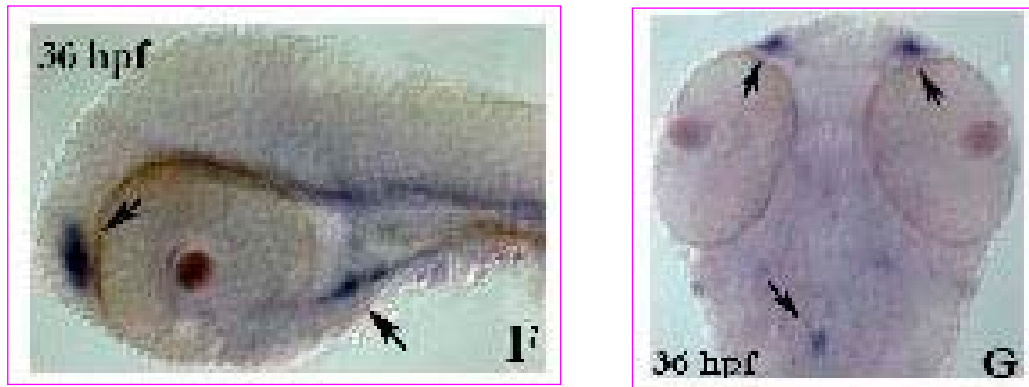
**Fig.23 mRNA di soul2 in ovario.**



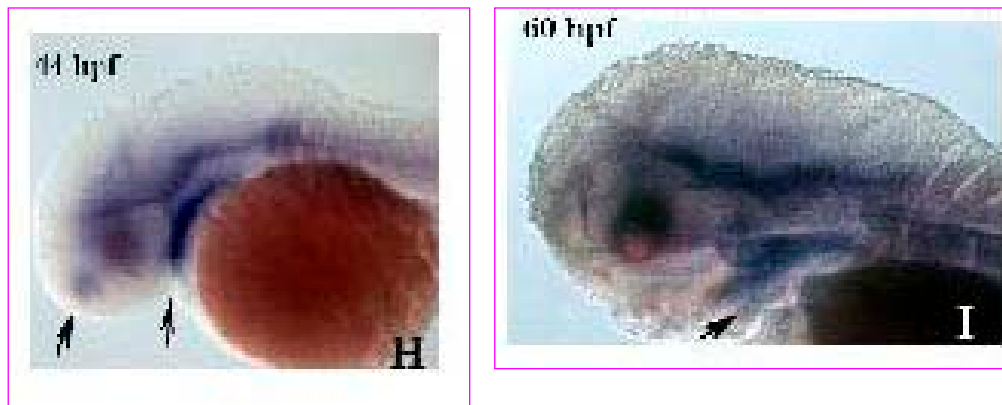
**Fig.24 Ibridazione in situ whole-mount per soul2 in embrioni di Zebrafish a diversi stadi di sviluppo. A: Espressione nell'embrione a 4 cellule; B: Espressione nella regione della cloaca a 18 ss; C (sezione): Espressione nel pronefro a 24 hpf.**



**Fig.24 D, E: Espressione nel pronefro nella regione del DL a 36 e 60 hpf.**



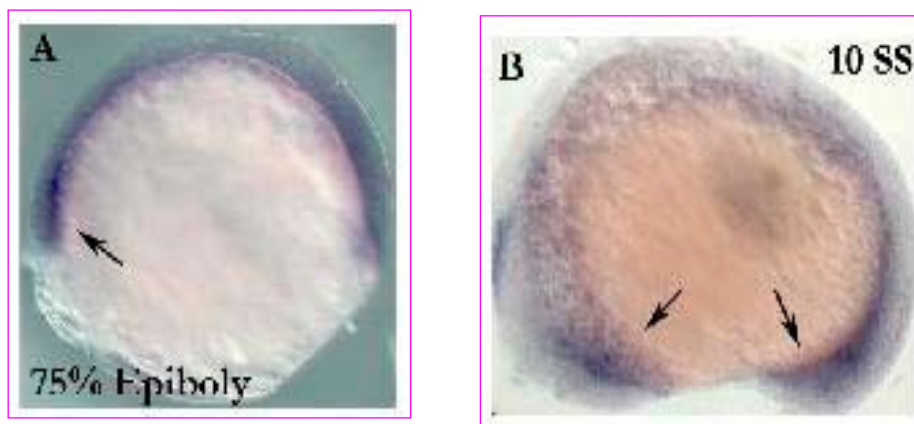
**Fig.24 F e G: Espressione nei placodi olfattivi e archi faringei a 36 hpf.**



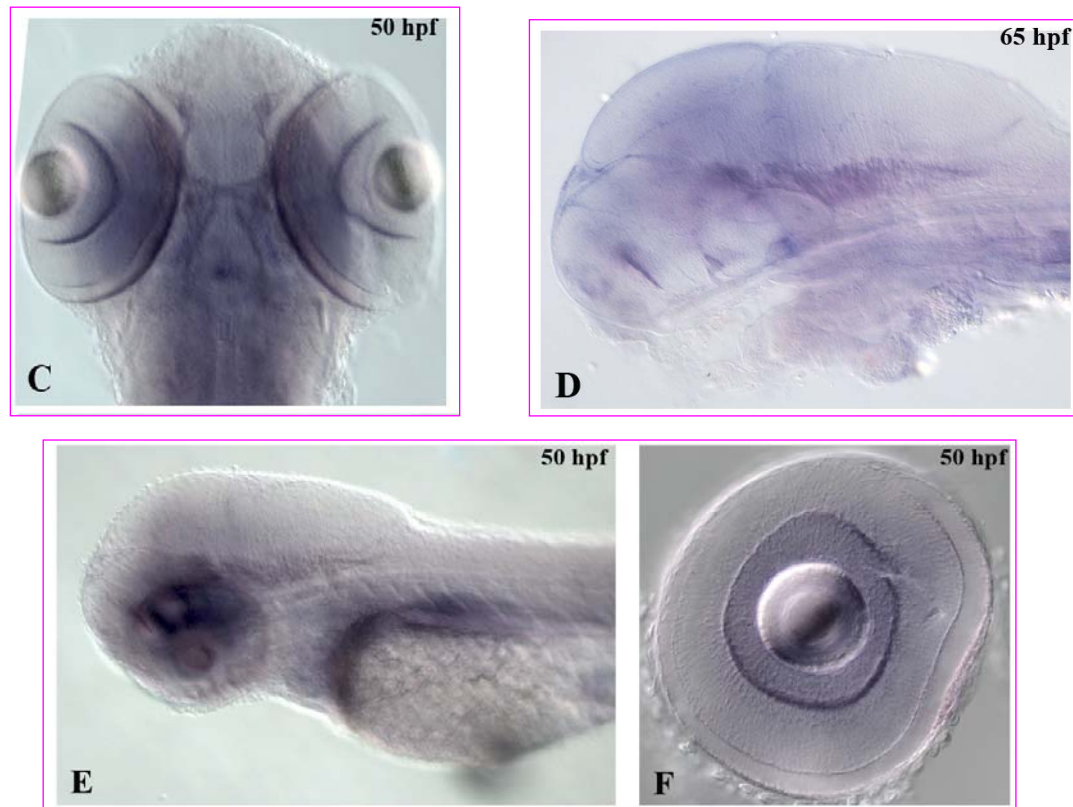
**Fig.24 H e I: Espressione nei placodi olfattivi e archi faringei a 44 hpf a 60 hpf.**

### 3.2.3. Analisi dell'espressione di *soul3* e *soul4*

Per quanto concerne il profilo di espressione del gene *soul3*, il trascritto è presente a partire dallo stadio di gastrula a livello dell'anello germinale. A circa 10 hpf si è rilevata la trascrizione di *soul3* nella porzione rostrale dell'embrione. Durante la somitogenesi, è stato osservato un abbassamento del livello di espressione di *soul3* fino alle 24 hpf, periodo in cui non è stato possibile rilevarne la presenza nell'embrione. Dalle 36 hpf e fino alle 70 hpf il segnale di *soul3* è stato evidenziato in diverse regioni del sistema nervoso: assoni, nervo ottico, retina e dalle 65 hpf, ghiandola pineale (**Fig.25**).



**Fig.25** Ibridazione in situ whole-mount per *soul3* in embrioni di Zebrafish a diversi stadi di sviluppo. A: Espressione nell'anello germinale in embrione al 75% di epibolia; B: Espressione nella porzione craniale e caudale dell'embrione a 10 ss.

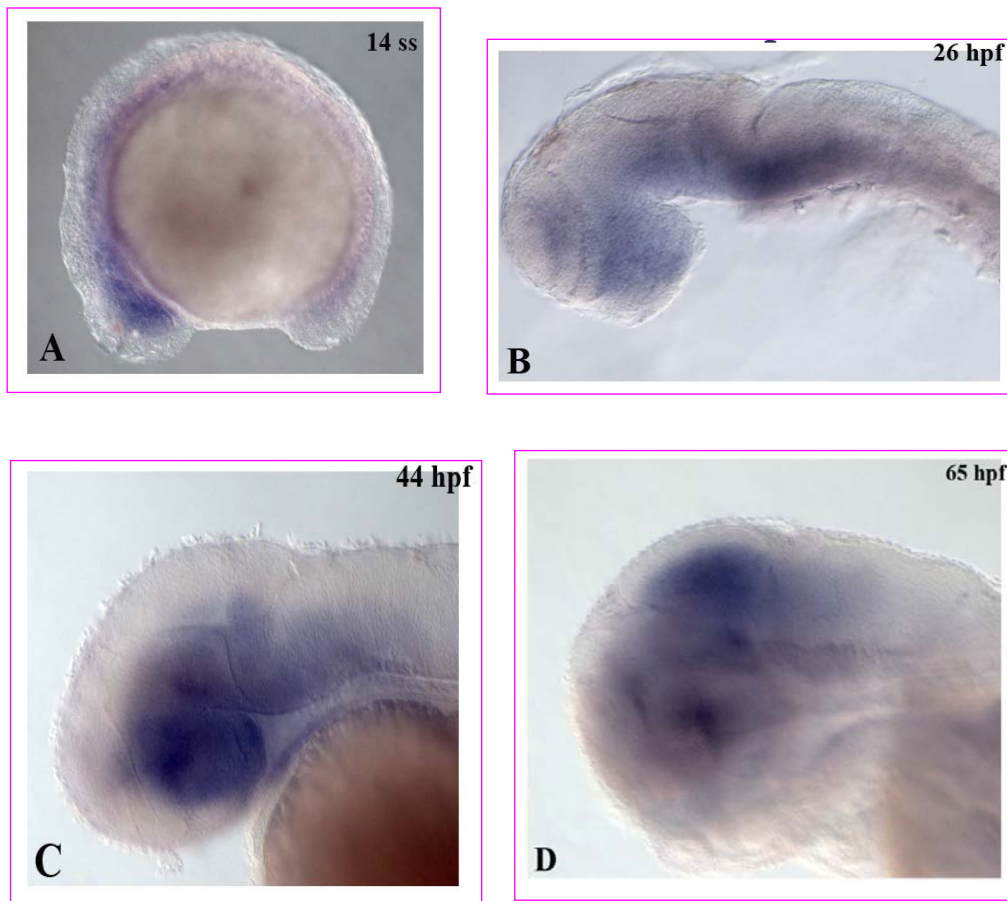


**Fig.25 C-F: Espressione nel sistema nervoso: assoni, nervo ottico, retina dalle 36 hpf fino alle 65 hpf dove è visibile un segnale anche nella ghiandola pineale.**

L'espressione di *soul4* è stata rilevata a inizio somitogenesi (circa 10 hpf) e fino alle 65 hpf, solo a livello del sistema nervoso. In particolare, il trascritto ha mostrato una specifica localizzazione nella commissura anteriore del diencefalo e nel romboencefalo (**Fig.26**).

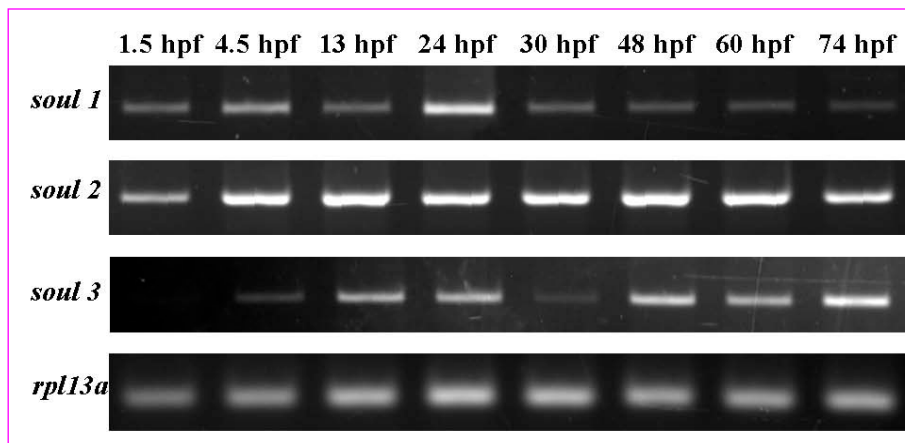
La dinamica spazio-temporale dei geni *soul* nel corso dello sviluppo di *Zebrafish* è stata confermata attraverso RT-PCR (**Fig.27**). L'RT-PCR che ha documentato la presenza dei trascritti agli stadi di sviluppo utilizzati per la caratterizzazione, ha permesso inoltre di valutare il diverso grado di espressione dei quattro geni nel corso dello sviluppo.





**Fig.26** Ibridazione in situ whole-mount per *soul4* in embrioni di Zebrafish a diversi stadi di sviluppo. A-E: L'espressione del trascritto è ristretta solo al sistema nervoso a partire dallo stadio di 10 hpf fino alle 65 hpf, in particolare nella commissura anteriore del diencefalo e nel romboencefalo.





**Fig.27 Dinamica spazio-temporale dei geni *soul* mediante RT-PCR**

Il profilo di espressione del gene *soul2* nei dotti pronefrici, di particolare interesse per lo studio del metabolismo del ferro, ha ad approfondire le conoscenze su questo gene nello sviluppo di *Zebrafish*. Per questo dopo aver studiato l'intera famiglia dal punto di vista filogenetico, strutturale e di espressione genica, è stata condotta un'analisi di tipo funzionale ristretta al solo gene *soul2*.

### **3.3. Espressione del gene *soul2* nei morfanti ematopoietici**

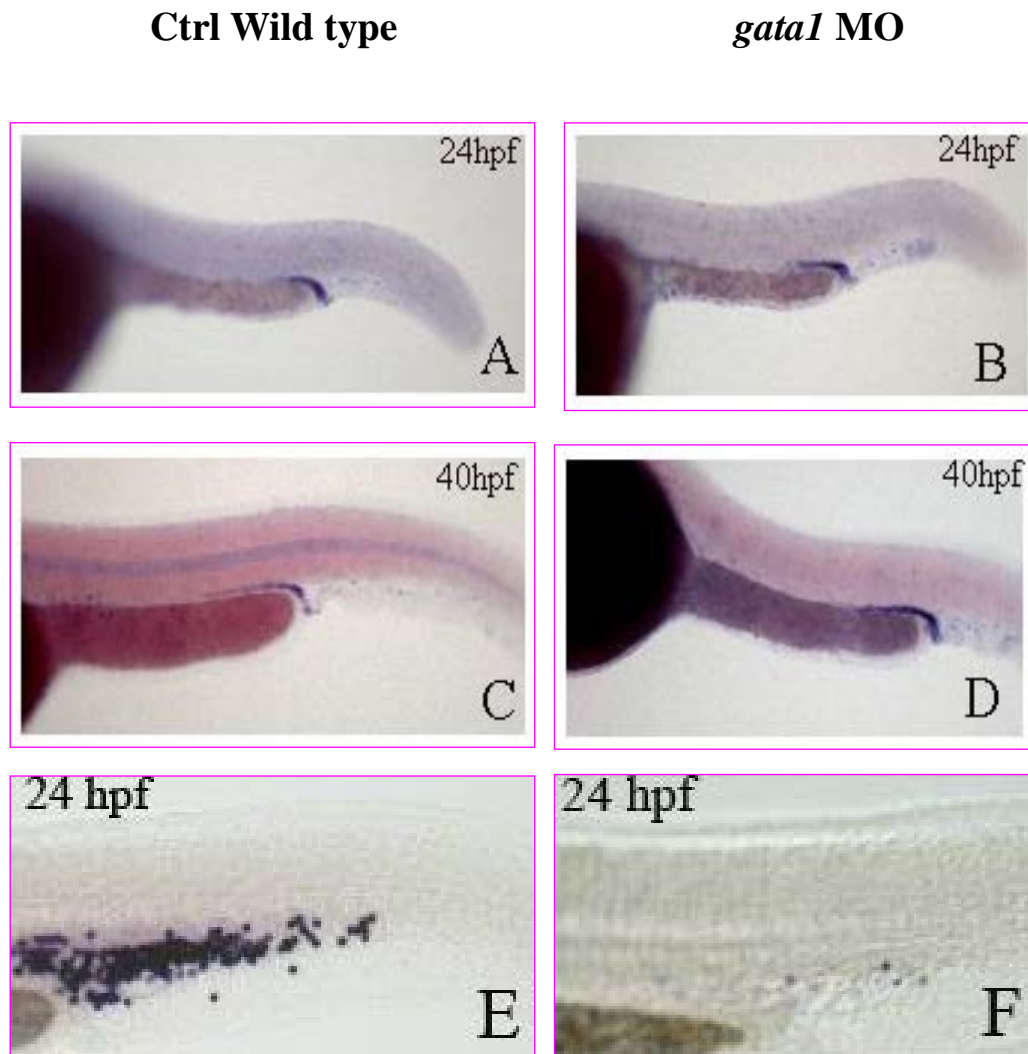
Per avere informazioni sulle possibili vie di segnale in cui il gene *soul2* può essere coinvolto sono stati effettuati esperimenti di ibridazione *in situ* utilizzando la sonda specifica per *soul2* su embrioni morfanti per il gene *gata1* a diversi stadi di sviluppo.

In tutti gli esperimenti effettuati ed esaminati, non sono stati osservate particolari alterazioni nell'espressione del gene *soul2*, né di intensità né di distribuzione della colorazione allo stadio di 24 e 40 hpf nei morfanti rispetto al controllo (**Fig.28 A-D**).

Per confermare la bontà del morfolino *gata1* gli embrioni iniettati sono stati ibridati con un marcatore eritropoietico *hbbe1* che non è più espresso nelle cellule del sangue dei morfanti (**Fig.28 E, F**)

Questi dati di caratterizzazione molecolare hanno dimostrato che *soul2* in

*Zebrafish* non è regolato da fattori di trascrizione ematopoietici.



**Fig.28** Ibridazione in situ whole-mount in embrioni *gata1* morfanti. A-D: L'espressione del trascritto del trascritto di *soul2* nel pronefro di embrioni wild type e morfanti a 24 e 40 hpf; E-F: Espressione del gene *hbbe1* nei morfanti ematopoietici *gata1* a 24 hpf.

### 3.4. Studi di gain-of-function mediante iniezione di mRNA

Dopo avere indagato la regolazione di *soul2* da parte di geni coinvolti in alcune tra le vie di segnalazione più importanti per lo sviluppo embrionale, è stato intrapreso uno studio di sovraespressione genica mediante iniezione di mRNA sintetizzato in vitro in embrioni allo stadio di una o due cellule.

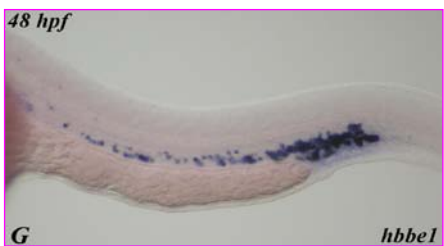
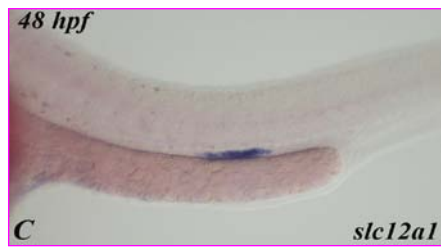
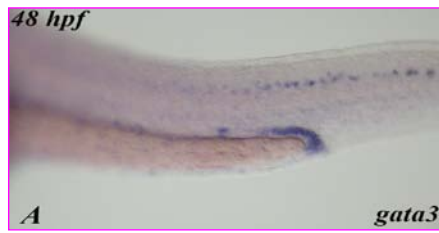
In questi studi di sovraespressione è stata effettuata un'ibridazione *in situ* con geni marcatori del pronefro ed ematopoietici. L'espressione di questi geni negli embrioni iniettati con l'mRNA di *soul2*, analizzata a 48 hpf, è apparsa distribuita in modo paragonabile a quella rilevata in embrioni non iniettati o iniettati con il solo mRNA. L'intensità della colorazione, però è apparsa diversa, nonostante la colorazione degli embrioni durante l'ibridazione *in situ* sia avvenuta per lo stesso intervallo di tempo; negli embrioni in cui *soul2* è sovraespresso, il segnale dei diversi marcatori è presente con intensità minore (**Fig.29**).

Una parte degli embrioni in cui *soul2* è stato sovraespresso è stata trattata con o-dianisidina per verificare cambiamenti nella distribuzione di emoglobina rispetto al controllo. Gli embrioni appaiono morfologicamente normali, anche se il livello di emoglobina nel sangue sembra essere più marcato allo stadio di 48 hpf (**Fig.30**).

Questi esperimenti preliminari, che dovranno esser confermati e validati con altri studi, suggeriscono che la sovraespressione di *soul2* nei primi stadi di sviluppo possa modificare il normale sviluppo del pronefro dell'embrione e la distribuzione delle cellule sanguigne.

*Ctrl wild type*

*soul2 mRNA*



**Fig.29 A-L: Espressione dei trascritti *gata3*, *slc12a1*, *trpm7*, *tfr1a* e *hhbe1* in embrioni selvatici e overespressi rispettivamente allo stadio di 48 hpf.**

wild type



soul2 mRNA



**Fig.29** *Embrioni overespressi trattati con o-dianisidina*

### 3.5. Studi di loss-of-function mediante iniezione di morfolino

Per stabilire il ruolo funzionale dell'ortologo *soul2* di *Zebrafish* durante lo sviluppo del rene pronefrico e per analizzare l'effetto a carico della maturazione eritrocitaria., sono stati condotti esperimenti di knock down mediante iniezioni di oligonucleotidi antisenso (morfolino) in embrioni di *Zebrafish* allo stadio di una o due cellule.

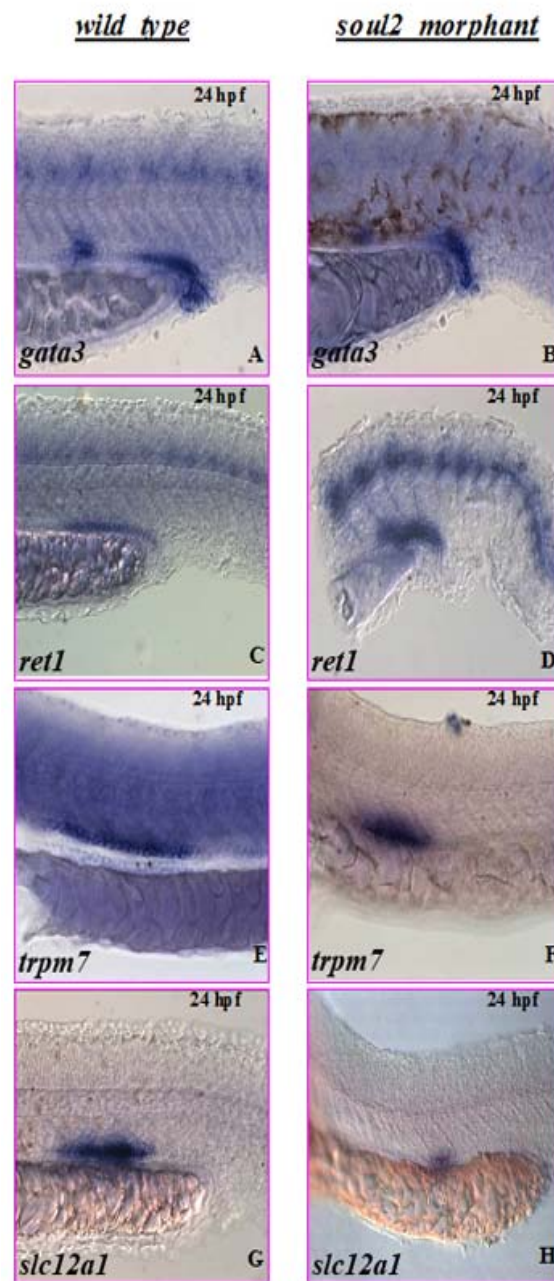
I morfanti di *soul2* trattati con 0.3 mM di morfolino mostrano un aumento di espressione del gene *ret1* circoscritto alla zona della cloaca e del PD a livello del 17° e 18° somite allo stadio di 24 hpf, al contrario degli embrioni non iniettati in cui il gene si esprime fino alla regione del DL a livello del 14-16° somite (**Fig.31 A, B**).

L'espressione del gene *gata3* nei medesimi morfanti si restringe alla zona della cloaca e il gene non appare più espresso nel corpuscolo di Stannio, contrariamente a quanto avviene negli embrioni selvatici non trattati, in cui esso è localizzato fino a livello del 14° somite, all'altezza del corpuscolo e del DL, allo stadio di 24 hpf (**Fig.31 C, D**).

Mentre negli embrioni selvatici di *Zebrafish* il gene *sc12a1* è espresso nella regione del DE tra il 12° e il 13° somite, in quelli microiniettati con il morfolino di *soul2*, allo stadio di 24 hpf, il trascritto appare regresso ed esteso anteriormente (**Fig.31 E, F**).

Il gene *trpm7* negli embrioni di 24 hpf non iniettati è localizzato nella regione del PST tra il 9° e l'11° somite, mentre la sua espressione nei morfanti appare ristretta anteriormente al 9° somite ed appare evidente un decremento dell'espressione del gene allo stesso stadio di sviluppo (**Fig.31 G, H**).

L'insieme di questi dati suggerisce che *soul2* non svolga un ruolo rilevante nelle fasi iniziali del differenziamento del rene embrionale di *Zebrafish*, ma che possa essere coinvolto, piuttosto, in un processo di migrazione cellulare.



**Fig.31 Ibridazione in situ whole-mount in embrioni soul2 morfanti. A-H:**  
**Espressione dei trascritti *gata3*, *ret1*, *trpm7* e *slc12a1* in embrioni selvatici di Zebrafish e soul2 morfanti rispettivamente allo stadio di 24 hpf.**

Per quanto concerne l'analisi di marcatori ematopoietici per analizzare l'effetto a carico della maturazione eritrocitaria, sono stati usati geni come la *beta globina1* e la *transferrina 1a*.

Dal confronto tra embrioni non trattati e quelli iniettati con 0.3mM di morfolino di *soul2* si è osservato un aumento delle cellule del sangue marcate con la *globina1* nella regione posteriore della coda e negli isolotti sanguigni del sacco vitellino (**Fig.32 A, B**).

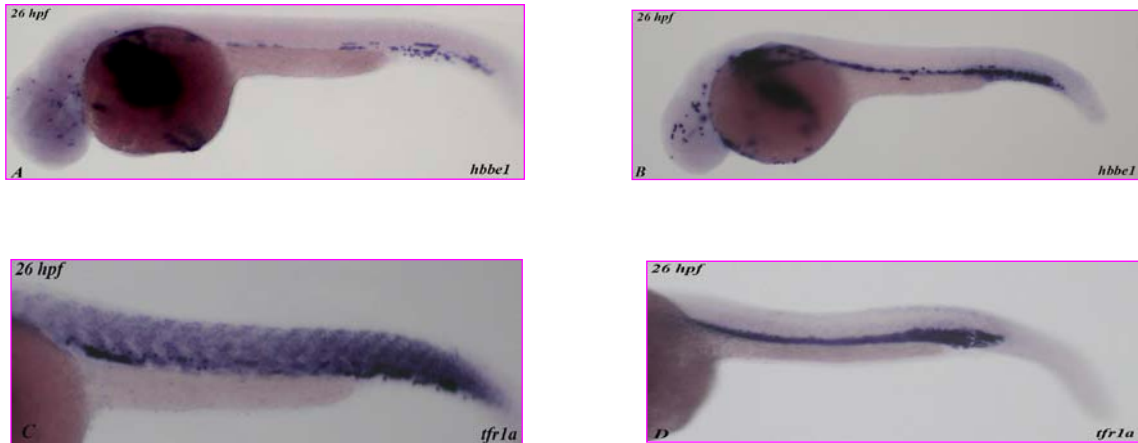
Gli embrioni *soul2* morfanti presentano un aumento dell'attività trascrizionale del gene *tfr1a* rispetto ai controlli, suggerendo un eventuale ruolo di partecipazione a meccanismi di trasporto ferro\eme (**Fig.32 C, D**).

Questi dati che mostrano come, in assenza di *soul2*, il livello di espressione di geni ematopoietici aumenti, indicano che il gene *soul2* possa in qualche modo essere coinvolto nell'inibizione della biosintesi di eme.



## wild type

## soul2 morphant



*Fig.32 Ibridazione in situ whole-mount in embrioni soul2 morfanti. A-B: Espressione del fattore di trascrizione hbb1 in embrioni selvatici di Zebrafish e soul2 morfanti rispettivamente allo stadio di 26 hpf; C-D: Espressione del trascritto tfr1a in embrioni selvatici e morfanti allo stesso stadio di sviluppo.*

### **3.6. Rescue mediante co-iniezione di morfolino ed mRNA**

Per testare la capacità del morfolino di bloccare la traduzione di *soul2*, è stato preparato un costrutto con la GFP a valle di *soul2*. L'mRNA di *soul2*-GFP-pCS2+ è stato iniettato nella stessa quantità, espressa in molarità, di morfolino negli embrioni a una cellula. Gli embrioni non iniettati sono stati usati come controllo positivo. A 5 hpf, l'mRNA di *soul2*-GFP-pCS2+ ha mostrato l'espressione della GFP nel blastoderma embrionale, a confermare il funzionamento dell'mRNA. Gli embrioni coiniettati con morfolino e messaggero sono apparsi morfologicamente normali a conferma della specificità del morfolino.

### **3.7. Effetti del morfolino sulla produzione di emoglobina**

Un secondo gruppo di embrioni microiniettato con entrambi gli oligo morfolino è stato trattato a 48 hpf e 72 hpf con o-dianisidina.

Nei morfanti di *soul2* si è ottenuto un effetto rilevante con la concentrazione di

0.3mM. La colorazione è risultata molto attenuata sui morfanti rispetto ai controlli. Col procedere dello sviluppo embrionale l'attenuazione della colorazione dell'emoglobina sui morfanti è apparsa sempre più netta rispetto ai controlli in conseguenza del maggiore numero di eritrociti che hanno generato una più marcata colorazione nei controlli.

Questi dati suggeriscono che l'effetto del morfolino di *soul2* sugli embrioni microiniettati provoca una diminuzione dell'espressione di emoglobina nel sangue, confermandone il coinvolgimento nell'eritrogenesi (**Fig.33**).

wild type

soul2 morphant

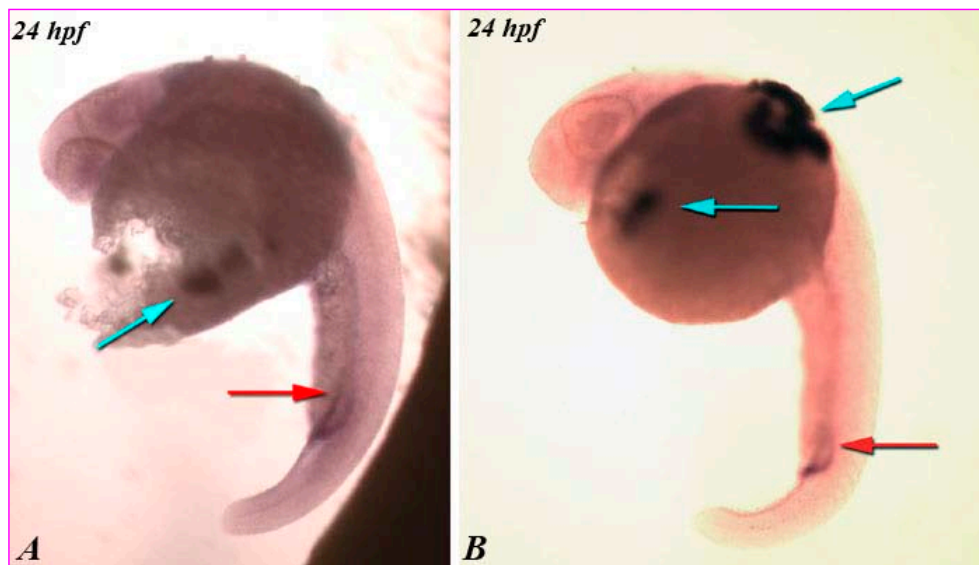


**Fig.33** *Embrioni microiniettati con morfolino di soul2 e trattati con benzidina.*

### 3.8. Esposizione farmacologia degli embrioni al succinil acetone

Embrioni di *Zebrafish* sono stati sottoposti a trattamenti farmacologici con succinil acetone.

Tutti gli embrioni sottoposti a tale trattamento non hanno mostrato alterazioni importanti nello sviluppo. Gli embrioni fissati sono stati ibridati con la sonda per *soul2* (24 hpf). L'unica differenza tra gli embrioni trattati e i controlli la si è riscontrata nei dotti pronefrici, dove l'mRNA di *soul2* appare meno esteso anteriormente (Fig.34 dati da riconfermare).

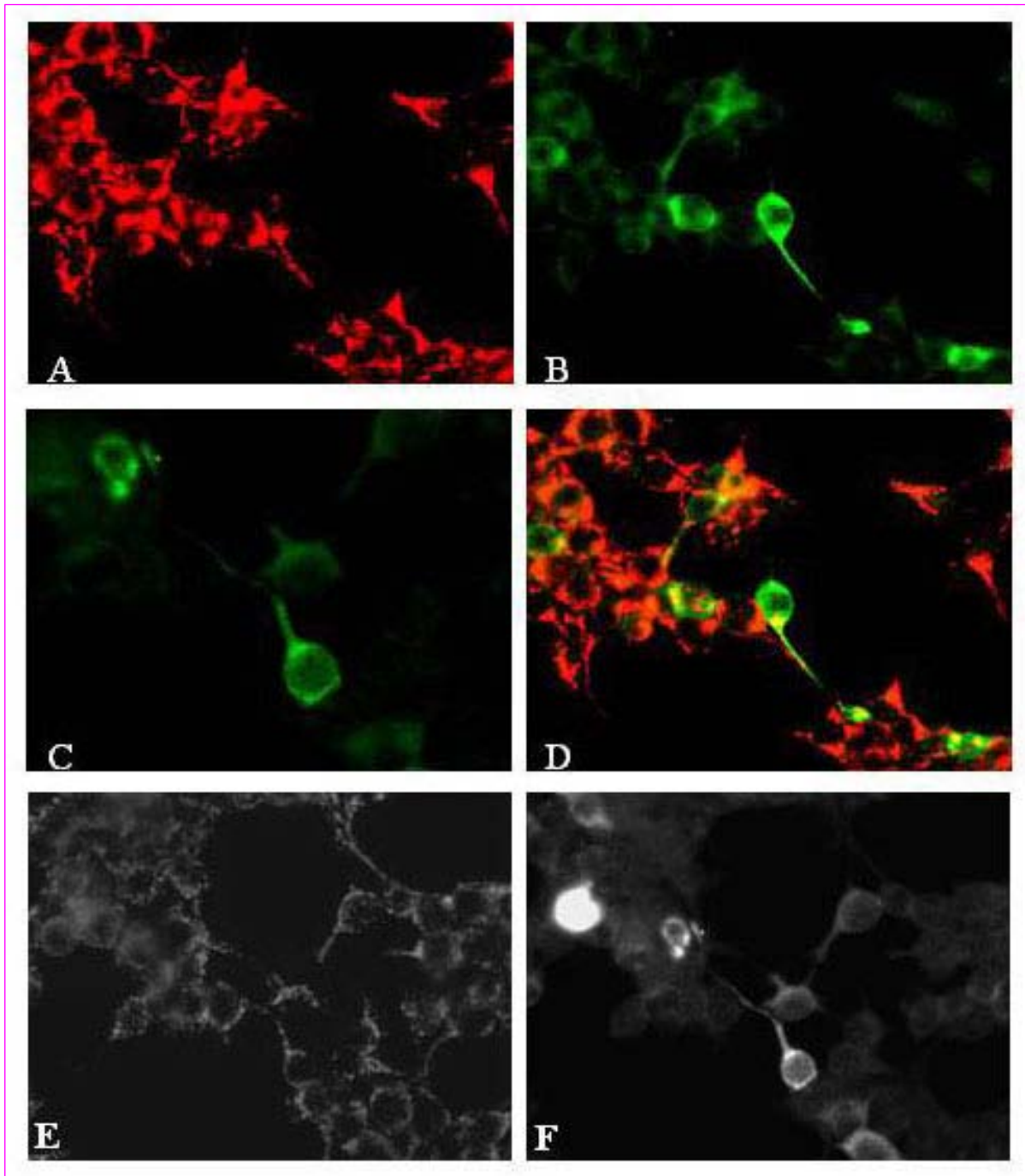


**Fig.34 Effetto del succinil acetone sul differenziamento dei dotti pronefrici. A: Controllo; B: embrione trattato con 15mM. Espressione del gene soul2 nei dotti pronefrici (freccia rossa) e nelle cellule del sangue (freccia blu).**

### **3.9. Localizzazione e funzione del gene *soul2***

Per confermare un coinvolgimento della proteina *soul2* nella biosintesi dell'eme sono stati effettuati esperimenti di transfezione in cellule endoteliali umane 293T.

In alcune cellule l'espressione della proteina *soul2* sembrava essere estesa oltre che nel mitocondrio anche ad altre regioni della cellula. Per verificare la localizzazione nel mitocondrio, ho utilizzato un anticorpo mitocondrio specifico, gentilmente acquistato dal Dott. Alan J. Davidson, MGH, Boston. Dalla sovrapposizione dei due segnali è stato possibile confermare la presenza della proteina *soul2* sia nel mitocondrio che nel citoplasma come mostrato in **Fig.35**. Ulteriori indagini dovranno essere effettuate per poter confermare tale dato, che suggerisce l'eventuale partecipazione della proteina *soul2* alla sintesi dell'eme.



*Fig.35 Localizzazione della proteina soul2 in cellule 293T*

### **3.10. Immunoprecipitazione della proteina soul2**

Da preliminari esperimenti di immunoprecipitazione, da ripetere e sottoporre a spettrometria di massa, è stato possibile osservare il legame tra la proteina soul2 con un'altra proteina la cui identificazione sarà rivelata da esperimenti di spettrometria di massa. La conoscenza del legame della proteina soul2 con un altre proteine nella cellula potrebbe essere essenziale per attribuire a soul2 un ruolo funzionale.

## 4. Discussione

Le proteine soul costituiscono una famiglia poco conosciuta di molecole in grado di legare eme (heme binding protein), e il loro ruolo durante lo sviluppo non è ancora stato studiato. Nel 1998, Taketani e collaboratori hanno studiato il gene *p22HBP*, descrivendone alcuni aspetti biochimici. La proteina p22HBP sembra essere coinvolta nel metabolismo del ferro, e in particolare nella biosintesi dell'eme in diverse tipologie di organi e cellule. Alla ricerca di geni coinvolti nella regolazione del ritmo circadiano, Mark J. Zylka e Steven M. Reppert individuarono nella retina e nella ghiandola pineale di pollo e topo la presenza di RNA codificati da un gene, da loro battezzati *soul*, molto simile a *p22HBP*, e istituirono la famiglia soul/HBP (Zylka e Reppert, 1999). Si ritiene che queste proteine regolino la concentrazione di porfirine o di eme, la cui produzione in eccesso può risultare tossica per la cellula (Blackmon et al., 2002). In particolare, un dominio idrofobico di dieci amminoacidi in posizione 73-82 sarebbe responsabile del legame con eme (Sato et al., 2004).

Nel corso del presente lavoro di dottorato, l'analisi delle banche dati di sequenze nucleotidiche e amminoacidiche ha dimostrato che i geni *soul* sono presenti in tutti gli organismi viventi, dai batteri alle piante agli animali (**Fig.17**).

Dall'allineamento delle varie proteine soul al quale è stata applicata l'analisi del software LOGO, è stata individuata una sequenza consenso nella quale è possibile riconoscere un pattern di residui tipico della famiglia proteica. Dal confronto tra i membri della famiglia, è emerso che il dominio idrofobico è principalmente caratterizzato dalla presenza di due coppie altamente conservate di amminoacidi, ovvero metionina e treonina in posizione 78 e 79, e prolina e valina in posizione 81 e 82, per le quali è lecito ipotizzare un ruolo specifico di legame con eme (Taketani et al., 1998; Sato et al., 2004). La sequenza consenso ha permesso anche di riconoscere una sequenza di 4 amminoacidi posti all'estremità carbossilica (N-E-V/I-M/W), e numerosi amminoacidi isolati, in prevalenza prolina (**Fig.16**). Per tali residui conservati è stato possibile ipotizzare un eventuale valore funzionale e/o strutturale.



Lo studio della filogenesi molecolare delle proteine *soul* ha permesso non solo di confermare l'identità dei geni di *Zebrafish*, ma anche di distinguere l'esistenza di diversi raggruppamenti, o sotto-raggruppamenti. In particolare, un'analisi preliminare dei rapporti filogenetici realizzata mediante il programma Neighbour-Joining ha evidenziato tre principali cladi: il primo caratterizzato da omologhi di batteri e piante, il secondo contenente geni distribuiti lungo l'intero arco sistematico ad eccezione dei batteri, ed il terzo specifico dei Cordati (**Fig.20**). Questo risultato permette di evidenziare come nuove copie di geni *soul* siano apparse per duplicazione genica o genomica.

Per isolare i geni *soul* presenti nel genoma di *Zebrafish*, sono state consultate varie banche dati, incluso il portale del sequenziamento del genoma e quelli di differenti progetti di sequenziamento di EST, consentendo l'individuazione di quattro membri della famiglia in questione. Il confronto delle sequenze dedotte delle proteine *soul* di *Zebrafish* con quelle di altre specie ha confermato l'appartenenza dei quattro geni alla famiglia dei geni *soul*. In assenza di un chiaro quadro nomenclaturale riguardante questa famiglia, per la quale sono utilizzati nomi diversi (*soul*, *placental protein 23*, *p22HBP*, *HEBP1* o *HEBP2*), gli omologhi di *Zebrafish* sono stati preliminarmente chiamati: *soul1*, *soul2*, *soul3* e *soul4*. Mediante programmi bioinformatici, le proteine di *Zebrafish* sono state analizzate per identificare eventuali domini funzionali. Da questi studi è emersa la presenza di un dominio transmembrana, situato all'estremità amminotermale di *soul2*, caratterizzato da un elevato grado di idrofobicità (scala di Kyte-Doolittle) (**Fig.17**), suggerendo un meccanismo di ancoraggio della proteina alla membrana cellulare.

L'analisi dell'espressione spazio-temporale dei quattro geni *soul* di *Zebrafish* durante lo sviluppo embrionale ha evidenziato l'attività di questi geni in diversi domini citologici ed embrionali, in parte condivisi.

In particolare tre sono gli aspetti che associano i geni *soul1* e *soul2* da un punto di vista citologico:

Entrambi i geni sono espressi durante l'oogenesi come contributo materno (**Fig.21** e **Fig.23**); durante l'embriogenesi, la prima evidenza di coespressione si riscontra

nella zona antero-ventrale del vitello dove è ristretta alle cellule ematopoietiche, anche se il segnale di *soul1* risulta meno intenso (**Fig.22** e **Fig.24**); un'altra regione di coespressione dei due orologi è evidente nel mesoderma somitico del tronco.

Viceversa, tre principali motivi distinguono l'attività di *soul1* da quella di *soul2*:

*soul2* presenta un dominio di espressione nei dotti pronefrici del rene embrionale (**Fig.24**), dove un iniziale segnale circoscritto alla porzione distale posteriore, nella regione cloacale, si estende anteriormente col procedere dello sviluppo embrionale (**Fig.24**) fino a raggiungere l'estremità anteriore del rene embrionale a 72hpf (**Fig.24**); *soul1* è espresso nella testa e nell'estensione del vitello.

L'espressione di *soul1* e *soul2* durante la maturazione dei gameti femminili di *Zebrafish* evoca l'attività del gene omologo RHBP, una heme binding protein coinvolta nella proliferazione e nel differenziamento degli oociti nell'insetto *Rhodnius prolixus*. In particolare, alla luce dell'interazione di RHBP con la membrana cellulare, la restrizione periferica nell'ooplasma dell'mRNA di *soul1* e *soul2*, e la presenza di un dominio transmembrana in *soul2*, suggeriscono come anche per le proteine soul di *Zebrafish* possa esistere un rapporto con la membrana cellulare (Braz et al., 2001).

L'espressione di *soul1* e *soul2* nelle cellule del sangue poste sul vitello, similmente all'espressione di alcuni geni coinvolti nell'ematopoiesi e nel metabolismo del ferro, permette di ipotizzare un coinvolgimento di queste proteine nel processo di differenziamento degli eritrociti, sia nei meccanismi di tipo "Non Transferrin Bound Iron (NTBI)", che in quelli di tipo "Trasferrin Bound Iron (TBI)", attraverso un coinvolgimento nella sintesi dell'eme. Inoltre la presenza del trascritto di *soul2* nel pronefro embrionale di *Zebrafish* evoca un probabile ruolo morfogenetico di questa proteina, avvalorando allo stesso tempo l'ipotesi di un ruolo ematopoietico, essendo il rene di *Zebrafish* il sito ematopoietico definitivo.

Per determinare con precisione in quale di questi processi (eritrogenesi e nefrogenesi) sia direttamente coinvolto il gene *soul2*, è stata inibita la traduzione delle proteine ("knock-down") mediante microiniezione di oligonucleotidi di tipo morfolino in uova appena fecondate di *Zebrafish* (Wang et al., 1998). Dal punto di

vista molecolare gli embrioni morfanti non hanno presentato marcate differenze nell'espressione di geni ematopoietici e renali rispetto al controllo, suggerendo che il gene *soul2* non svolga un ruolo morfogenetico e differenziativo fondamentale durante lo sviluppo del rene e del sangue. Tuttavia, per ciò che concerne il rene embrionale, l'evidente anteriorizzazione dei domini di espressione di alcuni geni espressi lungo i dotti autorizza ad ipotizzare un'implicazione del gene *soul2* nella migrazione delle cellule del pronefro. Ulteriori studi, quali doppie ibridazioni *in situ* con marcatori renali e studi di cell migration dovranno pertanto essere condotti al fine di poter attribuire con certezza tale funzione al gene *soul2*.

Nella ricerca di un collegamento con l'ematopoiesi, tra le varie ipotesi formulate nella programmazione degli esperimenti, la partecipazione all'internalizzazione del ferro associata al ciclo della transferrina è uno dei possibili ruoli considerati. In quest'ottica, gli embrioni morfanti per il gene *soul2* dovrebbero presentare difetti di differenziamento delle cellule del sangue, quali eritrociti ipocromici o alterazioni nell'espressione delle globine. Oppure, si attenderebbe di riscontrare anomalie nell'espressione di *soul2* in embrioni di linee mutanti ematopoietiche. In altre parole, l'ipotesi più accreditata era quella relativa al ruolo di *soul2* nella biosintesi o nel trasporto dell'eme, per il quale erano facilmente prevedibili dei fenotipi legati al momento in cui il gene avrebbe interagito con l'eme (Harigae et al., 1998; Wang et al., 1998). In particolare, nel caso in cui *soul2* fosse stato direttamente coinvolto nella biosintesi di eme, erano attesi degli embrioni morfanti con porfirie, malattie facilmente identificabili perché caratterizzate da eritroblasti fluorescenti. Al contrario, se il legame con l'eme fosse avvenuto durante il trasporto dal mitocondrio, si sarebbero dovuti osservare dei problemi nella sintesi dell'emoglobina, e quindi nella maturazione degli eritrociti. Se, invece, il fattore *soul2* fosse stato coinvolto nel processo di degradazione dell'eme e quindi avesse agito a livello dei macrofagi, si sarebbe dovuto ottenere un fenotipo caratterizzato da vasi sanguigni piccoli e otturati, in particolare nel rene (Drummond, 2000).

Gli embrioni sono stati dunque microiniettati con l'oligo morfolino di *soul2* e una parte di questi embrioni è stata successivamente trattata con o-dianisidina (**Fig.33**), mentre un'altra è stata caratterizzata con sonde specifiche per il sangue (**Fig.32**),

utilizzando come verifica embrioni morfolinati con *gata1* (**Fig.28**). L'effetto della microiniezione ha determinato un abbassamento della colorazione negli embrioni trattati con o-dianisidina rispetto ai controlli, indicando una diminuzione dell'emoglobina del sangue nei morfanti di *soul2*. Questo risultato è coerente con l'ipotesi di un ruolo di questa proteina nell'ematopoiesi. L'ibridazione *in situ* sui morfanti *gata1* con la sonda per *soul2* non ha mostrato un aumento dell'attività trascrizionale del gene, suggerendo che *soul2* non sia regolato da fattori trascrizionali eritropoietici (**Fig.28**), dato confermato dall'utilizzo del gene *hbbe1* che non è più espresso nei morfanti *gata1* come noto in letteratura (Galloway et al., 2005 ).

Per ulteriormente avvalorare l'ipotesi di un ruolo nella biosintesi dell'eme si è proceduto con l'individuazione della localizzazione del gene in cellule. La presenza della proteina *soul2* nel mitocondrio ha permesso di avvalorare l'ipotesi di un coinvolgimento nella sintesi di eme, essendo il mitocondrio la sede in cui avviene la produzione e l'immagazzinamento dell'eme. Altri esperimenti dovranno tuttavia essere effettuati per confermare a livello funzionale il dato di localizzazione.

L'espressione di *soul2* nei dotti pronefrici ha permesso anche di postulare per questo gene un ruolo di trasportatore di ferro durante la nefrogenesi.

Dal momento che per il differenziamento del rene è necessaria un'elevata quantità di ferro (Yang et al., 2003) *soul2* potrebbe intervenire da cofattore delle lipocaline nel meccanismo di riciclo del ferro liberato dal catabolismo dell'eme a seguito della lisi dei globuli rossi da parte dei macrofagi (Yang et al., 2003; Taketani et al., 2005), processo attivo nel territorio embrionale posto dorsalmente all'estremità posteriore dei dotti pronefrici.

Per avvalorare questa correlazione tra la disponibilità di eme e l'espressione di *soul2* durante la formazione del rene embrionale, gli embrioni sono stati trattati con diverse concentrazioni di succinil acetone, una sostanza che inibisce l'enzima *ALA-D* bloccando così la sintesi di eme. Tale blocco determina una minore produzione di RHBP, lasciando presupporre un nesso tra la disponibilità di eme e l'espressione genica (Braz et al., 2001). Tuttavia, il trattamento con succinil

acetone degli embrioni di *Zebrafish* non sembra impedire l'attivazione trascrizionale di *soul2* nei dotti pronefrici, escludendo un ruolo diretto di eme in tale processo (**Fig.34**). La riduzione dell'estensione del dominio trascrizionale di *soul2* nel pronefro potrebbe essere spiegata come conseguenza dell'effetto dell'assenza di eme, e quindi del riciclo del ferro, nella formazione dell'epitelio del rene embrionale. Questa ipotesi lascia aperta la possibilità che *soul2* possa essere coinvolto durante lo sviluppo del rene embrionale in un meccanismo di tipo NTBI.

I dati fin qui acquisiti saranno ulteriormente verificati mediante esperimenti tesi all'individuazione di proteine con cui si lega *soul2*, in modo da poterne meglio caratterizzare la funzione mediante il collegamento con meccanismi molecolari noti.

Da questo studio è stato possibile evidenziare il coinvolgimento del gene *soul2* nello sviluppo del rene embrionale di *Zebrafish*. Pur non essendo tale coinvolgimento determinante per la morfogenesi del primordio renale, l'implicazione nel processo ematopoietico rappresenta una valida ipotesi per un rapporto con il differenziamento terminale del suddetto organo. Ulteriori studi saranno necessari per determinare in quale preciso momento di tale processo l'attività del gene *soul2* interviene in maniera determinante.

## 5. Bibliografia:

- Taketani S.; Adachi Y.; Kohno H.; Ikehara Y.; Tokunaga R.; Ishii T.: Molecular Characterization of a Newly Identified Heme-binding Protein Induced during Differentiation of urine Erythroleukemia Cells. *The journal of biological chemistry* 273 47, 31388–31394, 1998.
- Zylka M.J.; Reppert S.M.: Discovery of a putative heme-binding protein family (SOUL/HBP) by two-tissue suppression subtractive hybridization and database searches. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 74: 175-181, 1999.
- Blackmon B.J., Dailey T.A., Lianchun X., Dailey H.A.: Characterization of a human and mouse tetrapyrrole-binding protein. *Arch of Biochem. and Biophys* 407, 196-201 2002.
- Sato E.; Sagami I.; Uchida T.; Sato A.; Kitagawa T.; Igarashi J.; Shimizu T.: SOUL in Mouse Eyes Is a New Hexameric Heme-Binding Protein with Characteristic Optical Absorption, Resonance Raman Spectral, and Heme-Binding. *Biochemistry* 43: 14189-14198, 2004.
- Dias, J. S., Macedo, A. L., Ferreira, G. C., Peterson, F. C., Volkman, B. F. & Goodfellow, B. J. (2006). *J. Biol. Chem.* 281, 31553–31561.
- Gell, D. A., Westman, B. J., Gorman, D., Liew, C., Welch, J. J., Weiss, M. J. & Mackay, J. P. (2006). *J. Mol. Biol.* 362, 287–297.
- Szigeti, A., Bellyei, S., Gasz, B., Boronkai, A., Hocsak, E., Minik, O., Bogнар, Z., Varbiro, G., Sumegi, B. & Gallyas, F. Jr (2006). *FEBS Lett.* 580, 6447– 6454.
- Kreimer G.: Phosphoproteomic Analysis of the Chlamydomonas Eyespot.

Plant Physiology Preview. DOI:10.1104/pp.107.109645, 2007.

- Filipe Freire, Maria Joao Romao, Anjos L. Macedo, Susana S. Aveiro, Brian J. Goodfellowb and Ana Luisa Carvalho: Preliminary structural characterization of human SOUL, a haem-binding protein. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications ISSN 1744-3091, 2009.
- Drummond IA, Majumdar A, Hentschel H et al. Early development of the Zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. Development 125, 4655–4667, 1998.
- Drummond IA. Making a Zebrafish kidney: a tale of two tubes. Trends Cell Biol 2003; 13: 357–365.
- Dressler GR. The cellular basis of kidney development. Annu Rev Cell Dev Biol 2006; 22: 509–529.
- Neely M.N., Pfeifer J.D. and Caparon M.: Streptococcus-Zebrafish model of bacterial pathogenesis. Infect Immun. 70, 3904-14, 2002.
- Prouty M.G., Correa N.E., Barker L.P., Jagadeeswaran P. and Klosen K.E.: Zebrafish-Mycobacterium marinum model for mycobacterial pathogenesis. FEMS Microbiol Letter 225, 177-82, 2003.
- Taylor M.R., Hurley J.B., Van Epps H.A. and Brokerhoff S.E. A Zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological disfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet. Proc Natl Acad Sci USA 101, 4584-9, 2004.
- Ernest S., Rauch G.J., Haffter P., Geisler R., Petit C. and Nicolson T.: Mariner is defective in myosin VIIA: a Zebrafish model for human hereditary

deafness. Hum Mol Genet 9, 2189-96, 2000.

- Bassett D.I. and Currie P.D.: Zebrafish as model for muscular dystrophy and congenital myopathy. Hum Mol Genet 12, Spec No 2, R265-70, 2003.
- Wang H., Long Q., Marty S.D., Sassa S. and Lin S.: A Zebrafish model for hepatoerythropoietic porphyria. Nat Genet 20, 239-43, 1998.
- Brand M., Heisenberg C.P., Jiang Y.J., Beuchle D., Lun K. Furutani-Seiki M., Granato M., Haffter P., Hammerschmidt M., Kane D.A. et al.: Mutations in Zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. Development 123, 179-90, 1996.
- Amsterdam A., Nissen R.M., Sun Z., Swindell E.C., Farrington S. and Hopkins N.: Identification of 315 genes essential for early Zebrafish development. Proc Natl Acad Sci USA 101, 12792-7, 2004.
- Nasevicius A. and Ekker S.C.: Effective targeted genes “knockdown” in Zebrafish. Nat Genet 26, 216-20, 2000.
- Tomasiewicz H.G., Flaherty D.B., Soria J.P. and Wood J.G.: Transgenic Zebrafish model of neurodegeneration. J Neurosci Res 70, 734-45, 2002.
- Stainier D.Y., Fouquet B., Chem J.N., Warren K.S., Weinstein B.M., Meiler S.E., Mohideen M.A., Neuhauss S.C., Solnica-Krezel N., Schier A.F. et al.: Mutations affecting the formation and the function of cardiovascular system in the Zebrafish embryo. Development 123, 285-92, 1996.
- Xu X., Meiler S.E., Zhong T.P., Mohideen M., Crossley D.A., Burggren W.W. and Fishman M.C.: Cardiomyopathy in Zebrafish due to mutation in an alternatively spliced exon of titin. Nat Genet 30, 205-9, 2002.



- Goldsmith P. and Harris W.A.: The Zebrafish as a tool for understanding the biology of visual disorders. *Semin Cell Dev Biol* 14, 11-8, 2003.
- Hebert SC, Reilly RF, Kriz W. Structural–functional relationships in the kidney. In: Schrier RW (ed). *Diseases of the Kidney and Urinary Tract*, 7<sup>th</sup> edn, Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, 2001 pp 3–57.
- Reilly RF, Ellison DH. Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiol Rev* 2000; 80: 277–313.
- Jacobson HR. Functional segmentation of the mammalian nephron. *Am J Physiol* 1981; 241: F203–F218.
- Serluca FC, Fishman MC. Pre-pattern in the pronephric kidney field of Zebrafish. *Development* 2001; 128: 2233–2241.
- Majumdar A, Drummond IA. Podocyte differentiation in the absence of endothelial cells as revealed in the Zebrafish avascular mutant, *cloche*. *Dev Genetics* 1999; 24: 220–229.
- Majumdar A, Drummond IA. The Zebrafish floating head mutant demonstrates podocytes play an important role in directing glomerular differentiation. *Dev Biol* 2000; 222: 147–157.
- Zhou X, Vize PD. Amino acid cotransporter SLC3A2 is selectively expressed in the early proximal segment of *Xenopus* pronephric kidney nephrons. *Gene Expr Patterns* 2005; 5: 774–777.
- Hostetter CL, Sullivan-Brown JL, Burdine RD. Zebrafish pronephros: a model for understanding cystic kidney disease. *Dev Dyn* 2003; 228:514–522.

- Reimschuessel R. A fish model of renal regeneration and development. *ILAR J* 2001; 42: 285–291.
- Drawbridge J, Meighan CM, Lumpkins R et al. Pronephric duct extension in amphibian embryos: migration and other mechanisms. *Dev Dyn* 2003; 226: 1–11.
- Nichane M, Van Campenhout C, Pendeville H et al. The Na<sup>+</sup>/PO<sub>4</sub> cotransporter *slc20a1* gene labels distinct restricted subdomains of the developing pronephros in *Xenopus* and Zebrafish embryos. *Gene Expr Patterns* 2006; 6: 667–672.
- Van Campenhout C, Nichane M, Antoniou A et al. *Evi1* is specifically expressed in the distal tubule and duct of the *Xenopus* pronephros and plays a role in its formation. *Dev Biol* 2006; 294: 203–219.
- Mobjerg N, Larsen EH, Jespersen A. Morphology of the kidney in larvae of *Bufo viridis* (Amphibia, Anura, Bufonidae). *J Morphol* 2000; 245: 177–195.
- Reggiani L, Raciti D, Airik R et al. The prepattern transcription factor *Irx3* directs nephron segment identity. *Genes Dev* 2007; 21: 2358–2370.
- Tran U, Pickney M, Ozpolat BD et al. *Xenopus* Bicaudal-C is required for the differentiation of the amphibian pronephros. *Dev Biol* 2007; 307: 152–164.
- Vize PD. The chloride conductance channel *ClC-K* is a specific marker for the *Xenopus* pronephric distal tubule and duct. *Gene Expr Patterns* 2003; 3: 347–350.
- Zhou X, Vize PD. Proximo-distal specialization of epithelial transport processes within the *Xenopus* pronephric kidney tubules. *Dev Biol* 2004; 271:

322–338.

- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the Zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253-310.
- Armstrong, P. B. (1932). The embryonic origin of function in the pronephros through differentiation and parenchyma-vascular association. *Am. J. Anat.* 51, 157-188.
- Newstead, J. D. and Ford, P. (1960). Studies on the development of the kidney of the Pacific Salmon, *Oncorhynchus forbuscha* (Walbaum). 1. The development of the pronephros. *Can. J. Zool.* 36, 15-21.
- Agarwal, S. and John, P. A. (1988). Studies on the development of the kidney of the guppy, *Lebistes reticulatus*. Part 1. The development of the pronephros. *J. Anim. Morphol. Physiol.* 35, 17-24.
- Agarwal, S. and John, P. A. (1988). Studies on the development of the kidney of the guppy, *Lebistes reticulatus*. Part 2. The development of the mesonephros. *J. Anim. Morphol. Physiol.* 35, 24-30.
- Tytler, P., Ireland, J. and Fitches, E. (1996). A study of the structure and function of the pronephros in the larvae of the turbot (*Scophthalmus maximus*) and the herring (*Clupea harengus*). *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* 28, 3-18.
- Goodrich, E. S. (1930). *Studies on the structure and development of vertebrates*. London: Macmillan.
- Wingert RA, Selleck R, Yu J, Song HD, Chen Z, Song A., Zohu Y., Thisse B., Thisse C., McMahon A.P., Davidson A.J.: The *cdx* genes and retinoic acid

control the positioning and segmentation of the Zebrafish pronephros. PLoS Genet 3(10): e189. doi:10.1371/journal.pgen.0030189, 2007.

- Calvet JP and Grantham JJ: The genetics and physiology of polycystic kidney disease. Semin Nephrol 21: 107-123, 2001.
- Sun Z, Amsterdam A, Pazour GJ, Cole DG, Miller MS, Hopkins N: A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney. Development 131: 4085-4093, 2004.
- Mead P.E, Zon L.: Molecular insights into early hematopoiesis Current Opinion in Hematology, 5 :156-160, 1998.
- Al-Adhami M.A.; Kunz Y.W.: Ontogenesis of haematopoietic sites in Brachydanio rerio Develop. Growth and Differ 19: 171-179, 1977.
- Davidson A.J., Zon L.I: The definitive and primitive guide to Zebrafish hematopoiesis Oncogene, 23: 7233-7246, 2004.
- Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, et al.: NHE3: A Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform of the brush border. Am J Physiol 265: F736–F742, 1993.
- Chen X, Tsukaguchi H, Chen XZ, Berger UV, Hediger MA: Molecular and functional analysis of SDCT2, a novel rat sodium-dependent dicarboxylate transporter. J Clin Invest 103: 1159–1168, 1999.
- Nielsen S, Maunsbach AB, Ecelbarger CA, Knepper MA: Ultrastructural localization of Na-K-2Cl cotransporter in thick ascending limb and macula densa of rat kidney. Am J Physiol 275: F885–F893, 1998.

- Schmitt R, Ellison DH, Farman N, Rossier BC, Reilly RF, et al.: Developmental expression of sodium entry pathways in rat nephron. *Am J Physiol* 276: F367–F381, 1999.
- Ma M, Jiang YJ: Jagged2a-Notch signaling mediates cell fate choice in the zebrafish pronephric duct. *PLoS Genetics* 3 (1): e18. doi:10.1371/journal.Pgen.0030018, 2007.
- Liu Y, Pathak N, Kramer-Zucker A, Drummond IA: Notch signaling controls the differentiation of transporting epithelia and multiciliated cells in the zebrafish pronephros. *Development* 134: 1111–1122, 2007.
- Drummond IA, Majumdar A, Hentschel H, Elger M, Solnica-Krezel L, et al.: Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development* 125: 4655–4667, 1998.
- Majumdar A, Drummond IA: The zebrafish floating head mutant demonstrates podocytes play an important role in directing glomerular differentiation. *Dev Biol* 222: 147–157, 2000.
- Andrews N.C.: Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nature Reviews* vol. 35: 208-217, 2000.
- Andrews N.C.: Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.* 341: 1986-1995, 1999.
- Wang H.; Long Q.; Marty S.; Lin S.: A zebrafish model for hepatoerythropoietic porphyria. *Nat Genet* 20: 239-43, 1998.